



**Universidade
de Aveiro
Ano 2012/2013**

Departamento de Química

**Ana Miguel
Cardoso Dionísio**

**Produção de oligossacarídeos por auto-
hidrólise**



**Ana Miguel
Cardoso Dionísio**

**Produção de oligossacarídeos por auto-
hidrólise**

Tese apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Química no ramo dos Recursos Renováveis e Biorrefinarias, realizada sob a orientação científica do Investigador Luís Jorge A. Chorão de Q. Duarte, Investigador Auxiliar da Unidade de Bioenergia do LNEG e cossupervisão do Doutor Armando Jorge Domingues Silvestre, Professor associado do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Dedico este trabalho aos meus pais, José e Maria

O júri

Presidente

Prof. Doutor Artur Manuel Soares da Silva

Professor catedrático do Departamento de Química da
Universidade de Aveiro

Luís Jorge A. Chorão de Q. Duarte

Investigador auxiliar da Unidade de Bioenergia do LNEG de
Lisboa

Doutora Paula Cristina Oliveira Rodrigues Pinto

Investigadora auxiliar do Laboratório Associado LSRE/LCM da
Universidade do Porto

Agradecimentos

Gostaria de expressar a minha gratidão, a todos aqueles que tornaram possível a realização deste trabalho

Ao Doutor Francisco Gírio, coordenador da Unidade de Bioenergia do LNEG, na qual realizei o estágio, pela possibilidade concedida.

Ao investigador Luís Duarte por me ter proporcionado a oportunidade de desenvolver este trabalho, pela excelente orientação científica, por toda a transmissão de conhecimento, pelo otimismo e apoio concedido. Muito obrigada!

Ao Prof. Doutor Armando Silvestre, pela orientação científica concedida, pelas oportunas sugestões e correções a esta dissertação, pela persistência e pela transmissão de conhecimento ao longo do meu percurso académico.

À Doutora Florbela, ao Doutor Rafal, à Doutora Luísa e à Céu, por toda a ajuda e profissionalismo.

À Patrícia e ao Pedro Branco, muito obrigada por tudo o que me ensinaram ao longo deste estágio, por toda a simpatia, ajuda e amizade prestada.

À Ivone que desde o início demonstrou ser uma excelente profissional e, acima de tudo, uma grande colega e amiga. Obrigada por todo o conhecimento transmitido, pela ajuda incondicional oferecida e pela boa disposição transmitida diariamente. Obrigada!

À Natália, colega de curso, de casa e de trabalho que acabou por se tornar uma amiga. Obrigada pela paciência, companhia, ajuda e carinho. Obrigada “marida”!

A todos os colegas do laboratório, pela ajuda e boa disposição transmitida ao longo deste estágio, em especial à Sofia, à Talita e à Marlene.

Aos meus pais e aos meus irmãos, os grandes responsáveis por tudo, pois sem vocês tudo seria muito mais difícil. Obrigada pelos sacrifícios, paciência e amor ao longo dos anos. Obrigada por acreditarem em mim!

Aos meus sogros pelo carinho e ajuda incondicional

Ao Luís, o meu refúgio nas situações mais complicada. Obrigada por todo o amor, amizade, paciência e apoio nos momentos mais difíceis. Sem ti, não tinha forças para chegar até aqui. Obrigada meu amor!

À minha segunda família, os amigos. Obrigada pela amizade prestada e apoio oferecido nos bons e nos maus momentos.

Palavras-chave

Auto-hidrólise; Biorrefinaria; Hemiceluloses; Materiais lenhocelulósicos; Oligossacarídeos

Resumo

As sementes estão entre principais subprodutos do processamento industrial de frutos e atualmente não existem, para a sua grande maioria, quaisquer processos de valorização para além da queima. Neste trabalho selecionaram-se quatro resíduos provenientes do processamento de frutos – casca de pinhão (CP), casca de caroço de pêssago (CCP), bagaço de azeitona extratado (BAE), sementes de anona (SA) - e foi estudado o processo de auto-hidrólise para a remoção seletiva das hemiceluloses e a produção de oligossacarídeos (OS).

Os OS produzidos a partir dos diversos materiais têm diferentes composições. A partir da CP obtiveram-se OS ricos em hexoses e pentoses, a partir da CCP foram obtidos xilo-oligossacarídeos substituídos com grupos acetilo. A partir do BAE foi possível obter oligossacarídeos ricos em arabinose, glucose e xilose e a partir de SA obtiveram-se essencialmente xilo-oligossacarídeos. Os diferentes OS produzidos são igualmente estáveis à temperatura ambiente e a 37°C. A 100°C todos os OS são estáveis na gama de pH 3-11, mas na gama pH 1-2 só os OS de CP e de SA são estáveis.

A cinética do processo de conversão das hemiceluloses em OS foi modelada, sendo possível desenvolver um modelo matemático que descreve o processo de auto-hidrólise para os diferentes materiais. Este modelo permitiu identificar o teor inicial de grupos acetilo como um dos fatores determinantes da cinética do processo. Foi ainda possível estabelecer uma relação entre a extensão da auto-hidrólise e a pressão do sistema para os diferentes tratamentos, o que poderá vir a permitir a monitorização *on-line* do processo.

Finalmente avaliou-se a composição fenólica dos hidrolisados obtidos e a digestibilidade enzimática da celulose remanescente nos materiais tratados, observando-se um aumento significativo da sacarificação da biomassa lenhocelulósica, com o aumento da severidade aplicada ao processo de auto-hidrólise.

Validou-se assim a possibilidade de aplicar uma estratégia integrada de valorização dos materiais em estudo, passível de ser transferida para outros materiais, no âmbito da biorrefinaria.

Keywords

Autohydrolysis; Biorefinery; Hemicelluloses; Lignocellulosic Materials; Oligosaccharides

Abstract

The seeds are between the main by-products of the industrial processing of fruits and currently, for the most part, valorization procedures beyond the burning are not known.

In the present work we selected seeds from four taxonomical distinct materials: *pinus pinea* shell (CP), peach pit shell (CCP), extracted olive pomace (BAE), cherimoya seeds (SA) – and the process of autohydrolysis was studied for the selective removal of hemicellulose and the production of oligosaccharides (OS).

The process kinetics was different for the four materials and the OS produced have different chemical compositions and thus putative different properties. From CP, hexose- and pentose-rich OS were obtained and from CCP, xylo-oligosaccharides substituted with acetyl groups were the main products. From BAE it was possible to obtain arabinose, glucose and xylose rich OS and from SA xylo-oligosaccharides essentially. The different OS produced are equally stable at room temperature and 37°C. At 100°C all OS produced are stable, in pH ranges between 3 and 11, but in pH ranges 1-2, the OS present only in CP and SA were stable.

It was possible to establish mathematical models which describe the auto-hydrolysis process of the different materials and these models enabled to identify the acetyl groups' content of biomass as one of the major determinant of the kinetic behavior. A relationship between the extension of autohydrolysis and system pressure was also found, which will permit the on-line monitorization of the process.

Finally the phenolic composition of the hydrolysates was evaluated, as well as the enzymatic digestibility of the remaining cellulose in the pretreated material. The results show a significant increase of saccharification as a function of the auto-hydrolysis severity.

As well, was validated the possibly of applying an integrated strategy for valorization of the materials under study was developed and we believe that it is possible to transfer it to other materials within the biorefinery concept.

Lista de abreviaturas

| | |
|----------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| A | massa de amostra |
| Ac | Grupos acetilo |
| AOS | Arabino-oligossacarídeos |
| Ara | Arabinose |
| Arn | Arabinanas |
| BAE | Bagaço de azeitona extratado |
| CCP | Casca de caroço de pêssgo |
| Cin _z | Cinza |
| CP | Casca de pinhão |
| CZE | Eletroforese capilar de zona (do inglês “ <i>Capillary Zone Eletrophoresis</i> ”) |
| DAD | Detetor de fotodíodos (do inglês “ <i>Diode Array Detector</i> ”) |
| DNS | Ácido 2-hidroxi-3,5-dinitrobenzoico ou ácido 3,5-dinitrosalicílico (do inglês “ <i>3,5-Dinitrosalicylic acid</i> ”) |
| E _a | Energia de ativação |
| F | Fator de correção |
| FOS | Fruto-oligossacarídeos |
| FPase | Atividade celulolítica total sobre papel de filtro |
| Fru | Frutose |
| Furf | Furfural |
| GAE | Equivalentes de ácido gálico (do inglês “ <i>Gallic Acid Equivalents</i> ”) |
| Gal | Galactose |
| GalOS | Galacto-oligossacarídeos |
| Glc | Glucose |
| Glc _p | Glucopirranose |
| Gn | Glucanas |
| GOS | Gluco-oligossacarídeos |
| H | Humidade |
| HAc | Ácido acético |
| HCOOH | Ácido fórmico |
| Hemicel _D | Fração de hemicelulose dificilmente hidrolisável |
| Hemicel _F | Fração de hemicelulose facilmente hidrolisável |
| HFor | Ácido fórmico |
| HLev | Ácido levulínico |
| HMF | 5-Hidroximetil-furfural |
| HPLC | Cromatografia Líquida de Alta Pressão (do inglês “ <i>High Performance Liquid Chromatography</i> ”) |
| HSI | Índice de Seletividade para as Hemiceluloses (do inglês “ <i>Hemicellulose Selectivity Index</i> ”) |
| IR | Índice de refração |
| KBCS | Sistema de monitorização e controlo baseado no conhecimento (do inglês “ <i>Knowledge Based Control System</i> ”) |
| LK | Lenhina de Klason |
| LNEG | Laboratório Nacional de Energia e Geologia ¹ |
| Man | Manose |

¹ www.lneg.pt

Lista de Abreviaturas

| | |
|-----------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Manp | Manopirranose |
| ML | Materiais lenhocelulósicos |
| Monoss | Monossacarídeos |
| MP | Matéria-prima |
| NDOS | Oligossacarídeos não digeríveis (do inglês “ <i>Non-digestible oligosaccharides</i> ”) |
| NREL | Laboratório Nacional de Energias Renováveis (do inglês “ <i>National Renewable Energy Laboratory</i> ”) ² |
| OS | Oligossacarídeos |
| OS _H | Oligossacarídeos de alto peso molecular |
| OS _L | Oligossacarídeos de baixo peso molecular |
| PD | Produtos de degradação |
| PNP | <i>p</i> -nitrofenol |
| PNPG | <i>p</i> -nitrofenil-β-D-glucopiranosídeo |
| RIA | massa do resíduo insolúvel em ácido |
| RLS | Razão Líquido/Sólido |
| SA | Sementes de anona |
| UB | Unidade de Bioenergia do LNEG |
| UCASUL | União de Cooperativas Agrícolas do Sul, Ucrl |
| XGs | Xiloglucanas |
| Xn | Xilanas |
| XOS | Xilo-oligossacarídeos |
| Xyl | Xilose |
| Xylp | Xilopirranose |

² www.nrel.gov

Índice

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------|-------|
| Palavras-chave..... | xi |
| Resumo..... | xi |
| Keywords | xiii |
| Abstract | xiii |
| Lista de abreviaturas..... | xv |
| Índice | xvii |
| Lista de figuras | xxi |
| Lista de quadros | xxv |
| Enquadramento..... | xxvii |
| 1 Introdução | 1 |
| 1.1 Biomassa e biorrefinarias | 1 |
| 1.2 Materiais lenhocelulósicos | 2 |
| 1.2.1 Composição dos materiais lenhocelulósicos | 3 |
| 1.2.1.1 Celulose..... | 3 |
| 1.2.1.2 Hemiceluloses | 3 |
| 1.2.1.3 Lenhina | 7 |
| 1.2.1.4 Extratáveis..... | 9 |
| 1.3 Oligossacarídeos como produtos de valor acrescentado das biorrefinarias | 9 |
| 1.3.1 Definição, propriedades aplicações e mercado | 9 |
| 1.3.2 Métodos de produção de OS | 11 |
| 1.3.2.1 Métodos hidrotérmicos | 12 |
| 1.3.2.1.1 Auto-hidrólise | 12 |
| 1.3.2.1.2 Explosão com vapor | 12 |
| 1.3.2.2 Hidrólise ácida | 13 |
| 1.3.2.2.1 Hidrólise com ácidos concentrados | 13 |
| 1.3.2.2.2 Hidrólise com ácidos diluídos | 13 |
| 1.3.2.3 O Índice de Seletividade (HSI) | 14 |
| 1.4 Modelação matemática do fracionamento dos materiais | 14 |
| 1.4.1 Fator de severidade..... | 15 |
| 1.4.2 Modelos cinéticos pseudo-homogéneos..... | 15 |
| 1.5 Novas fontes de oligossacarídeos..... | 17 |
| 1.5.1 Casca de pinhão..... | 18 |
| 1.5.2 Caroco de pêssago | 19 |
| 1.5.3 O Bagaço de azeitona extratado | 20 |
| 1.5.3.1 Tecnologias atuais de valorização do BAE | 21 |

| | | |
|-----------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1.5.4 | Sementes de anona | 22 |
| 1.6 | Objetivos do trabalho | 22 |
| 2 | Materiais e Métodos..... | 25 |
| 2.1 | Materiais..... | 25 |
| 2.1.1 | Preparação dos materiais | 25 |
| 2.1.1.1 | Casca de Pinhão | 25 |
| 2.1.1.2 | Casca do caroço de pêsego | 25 |
| 2.1.1.3 | Bagajo de azeitona extratado..... | 26 |
| 2.1.1.4 | Sementes de Anona..... | 26 |
| 2.2 | Obtenção de oligossacarídeos por auto-hidrólise..... | 26 |
| 2.3 | Avaliação da estabilidade dos licores ao armazenamento | 28 |
| 2.4 | Liofilização dos licores | 28 |
| 2.5 | Avaliação da estabilidade dos OS em função do pH e da temperatura..... | 28 |
| 2.6 | Determinação da digestibilidade enzimática da biomassa tratada | 29 |
| 2.7 | Métodos Analíticos | 30 |
| 2.7.1 | Caracterização física dos materiais | 30 |
| 2.7.1.1 | Análise granulométrica | 30 |
| 2.7.1.2 | Determinação da densidade | 30 |
| 2.7.2 | Caracterização química dos materiais e resíduos sólidos..... | 31 |
| 2.7.2.1 | Teor de humidade | 31 |
| 2.7.2.2 | Teor de cinza..... | 31 |
| 2.7.2.3 | Teor de extratáveis | 31 |
| 2.7.2.4 | Teor de proteínas..... | 32 |
| 2.7.2.5 | Quantificação de polissacarídeos estruturais e lenhina | 32 |
| 2.7.3 | Caracterização química dos licores | 33 |
| 2.7.3.1 | Doseamento de monossacarídeos, ácidos alifáticos e furanos por HPLC .. | 33 |
| 2.7.3.2 | Doseamento de oligossacarídeos | 34 |
| 2.7.3.3 | Determinação do grau de polimerização dos oligossacarídeos..... | 34 |
| 2.7.3.4 | Doseamento de compostos fenólicos | 35 |
| 2.7.3.4.1 | Método de Folin-Cicalteu | 35 |
| 2.7.3.4.2 | Método eletroforético | 35 |
| 2.7.4 | Quantificação da atividade das enzimas comerciais | 36 |
| 3 | Resultados e discussão | 39 |
| 3.1 | Caracterização físico-química dos materiais..... | 39 |
| 3.1.1 | Seleção, obtenção e caracterização dos lotes dos materiais a utilizar no processo de auto-hidrólise | 39 |
| 3.1.1.1 | Otimização da cominuição dos materiais | 39 |

| | | |
|---------|--------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 3.1.1.2 | Caracterização da distribuição granulométrica | 41 |
| 3.1.1.3 | Determinação da densidade | 42 |
| 3.1.1.4 | Caracterização química | 43 |
| 3.2 | Caracterização do perfil de auto-hidrólise para os diferentes materiais..... | 46 |
| 3.2.1 | Caracterização química dos licores obtidos | 48 |
| 3.2.1.1 | Casca de pinhão | 50 |
| 3.2.1.2 | Casca de caroço de pêssgo | 55 |
| 3.2.1.3 | BAE..... | 61 |
| 3.2.1.4 | Sementes de anona | 66 |
| 3.2.2 | Estudo comparativo da composição em oligossacarídeos dos licores obtidos na auto-hidrólise | 70 |
| 3.2.3 | Efeito da composição do hidrolisado na pressão do sistema | 73 |
| 3.2.4 | Caracterização química dos sólidos resultantes | 76 |
| 3.3 | Modelação matemática da hidrólise das hemiceluloses | 77 |
| 3.4 | Avaliação da estabilidade dos licores, durante o armazenamento | 83 |
| 3.5 | Purificação dos licores | 85 |
| 3.6 | Avaliação da estabilidade dos OS em função do pH e temperatura..... | 86 |
| 3.7 | Caracterização da digestibilidade enzimática dos resíduos sólidos obtidos | 88 |
| 4 | Conclusões e perspectivas | 93 |
| 5 | Referências bibliográficas..... | 99 |
| 6 | Anexos | 109 |
| A. | Determinação das atividades enzimáticas | 109 |
| I. | Método do DNS | 109 |
| II. | Cálculo das atividades enzimáticas | 110 |
| B. | Formulário | 113 |
| III. | Métodos analíticos..... | 113 |
| IV. | Quantificação de polissacarídeos estruturais e lenhina em amostras sólidas..... | 114 |
| V. | Cálculo de rendimentos | 115 |

Lista de figuras

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1 Ilustração do conceito de biorrefinaria..... | 2 |
| Figura 2 Representação estrutural esquemática das hemiceluloses mais comuns presentes nas folhosas: <i>O</i> -acetil-metilglucuronoxilana | 5 |
| Figura 3 Representação estrutural simplificada das hemiceluloses mais comuns presentes nas resinosas: as <i>O</i> -acetil-galactoglucomana | 7 |
| Figura 4 Álcoois precursores da lenhina: álcool <i>p</i> -cumarílico; álcool coniferílico e álcool sinapílico..... | 8 |
| Figura 5 A) Pinheiro manso, B) Pinha, C) Pinhão, D) Casca de pinhão e E) Miolo de pinhão | 18 |
| Figura 6 Produção mundial de pêssego (10^6 ton/ano) | 19 |
| Figura 7 Estrutura do pêssego: A) Pele ou exocarpo, B) Mesocarpo, C) Endocarpo ou caroço, D) Casca do caroço e E) Amêndoa | 19 |
| Figura 8 Produção mundial de azeite (10^6 ton/ano) | 20 |
| Figura 9 BAE..... | 21 |
| Figura 10 Estrutura da <i>Annona cherimola</i> Mill.: A) Pele ou exocarpo, B) Mesocarpo e C) Sementes..... | 22 |
| Figura 11 Representação esquemática da organização dos passos envolvidos neste trabalho e respectivos mercados de aplicação para os produtos desenvolvidos..... | 24 |
| Figura 12 Reator Parr® e respectivo controlador utilizado neste trabalho | 27 |
| Figura 13 Percentagem de partículas com um diâmetro acima de 4,00 mm, de casca de pinhão e de casca de caroço de pêssego, em função do tempo de cominuição | 40 |
| Figura 14 Distribuição granulométrica (%) da casca de pinhão, da casca de caroço de pêssego; do BAE e das sementes de anona | 41 |
| Figura 15 Perfis de aquecimento para os ensaios de auto-hidrólise da casca de pinhão a 150°C, 170°C, 190°C, 210°C e 230°C..... | 46 |
| Figura 16 Perfis de temperatura dos ensaios de auto-hidrólise do BAE durante 2h e durante 4h | 47 |
| Figura 17 Relação entre o material solubilizado (%) em função das hemiceluloses presentes | 49 |
| Figura 18 Perfil de material solubilizado (%), em função do Log R_0 , dos ensaios de auto-hidrólise da casca de pinhão, casca de caroço de pêssego, BAE e sementes de anona..... | 50 |
| Figura 19 Perfil da concentração de oligossacarídeos (gL^{-1}) em função do Log R_0 nos ensaios de auto-hidrólise da casca de pinhão | 50 |
| Figura 20 Perfil da concentração de monossacarídeos (gL^{-1}) em função de Log R_0 nos ensaios de auto-hidrólise da casca de pinhão | 51 |
| Figura 21 Perfil da concentração de ácidos alifáticos (gL^{-1}) em função de Log R_0 nos ensaios de auto-hidrólise da casca de pinhão | 52 |
| Figura 22 Perfil da concentração de compostos furânicos (gL^{-1}) em função de Log R_0 nos ensaios de auto-hidrólise da casca de pinhão | 53 |
| Figura 23 Perfil de o pH ao longo das condições de severidade aplicadas nos ensaios de auto-hidrólise da casca de pinhão | 54 |
| Figura 24 Perfil da concentração de compostos fenólicos (gL^{-1}) em função de Log R_0 nos ensaios de auto-hidrólise da casca de pinhão | 54 |

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 25 Perfil da concentração de oligossacarídeos (gL^{-1}) em função do $\text{Log } R_0$ nos ensaios de auto-hidrólise da casca do caroço de pêssego..... | 56 |
| Figura 26 Perfil da concentração de monossacarídeos (gL^{-1}) em função de $\text{Log } R_0$ nos ensaios de auto-hidrólise da casca de caroço de pêssego..... | 57 |
| Figura 27 Perfil da concentração de ácidos alifáticos (gL^{-1}) em função de $\text{Log } R_0$ nos ensaios de auto-hidrólise da casca de caroço de pêssego..... | 58 |
| Figura 28 Perfil da concentração de compostos furânicos (gL^{-1}) em função de $\text{Log } R_0$ nos ensaios de auto-hidrólise da casca de caroço de pêssego..... | 59 |
| Figura 29 Perfil de pH ao longo das condições de severidade aplicadas nos ensaios de auto-hidrólise da casca de caroço de pêssego..... | 60 |
| Figura 30 Perfil da concentração de compostos fenólicos (gL^{-1}) em função de $\text{Log } R_0$ nos ensaios de auto-hidrólise da casca de caroço de pêssego..... | 60 |
| Figura 31 Perfil da concentração de oligossacarídeos (gL^{-1}) em função do $\text{Log } R_0$ nos ensaios de auto-hidrólise do BAE..... | 62 |
| Figura 32 Perfil da concentração de monossacarídeos (gL^{-1}) em função de $\text{Log } R_0$ nos ensaios de auto-hidrólise do BAE..... | 63 |
| Figura 33 Perfil da concentração de ácidos alifáticos (gL^{-1}) em função de $\text{Log } R_0$ nos ensaios de auto-hidrólise do BAE..... | 64 |
| Figura 34 Perfil da concentração de compostos furânicos (gL^{-1}) em função de $\text{Log } R_0$ nos ensaios de auto-hidrólise do BAE..... | 65 |
| Figura 35 Perfil da concentração de compostos fenólicos (gL^{-1}) em função de $\text{Log } R_0$ nos ensaios de auto-hidrólise do BAE..... | 65 |
| Figura 36 Perfil da concentração de oligossacarídeos (gL^{-1}) em função do $\text{Log } R_0$ nos ensaios de auto-hidrólise das sementes de anona..... | 66 |
| Figura 37 Perfil da concentração de monossacarídeos (gL^{-1}) em função de $\text{Log } R_0$ nos ensaios de auto-hidrólise das sementes de anona..... | 67 |
| Figura 38 Perfil da concentração de ácidos alifáticos (gL^{-1}) em função de $\text{Log } R_0$ nos ensaios de auto-hidrólise das sementes de anona..... | 68 |
| Figura 39 Perfil da concentração de compostos furânicos (g/L) em função de $\text{Log } R_0$ nos ensaios de auto-hidrólise das sementes de anona..... | 68 |
| Figura 40 Perfil da concentração de compostos fenólicos (gL^{-1}) em função de $\text{Log } R_0$ nos ensaios de auto-hidrólise das sementes de anona..... | 69 |
| Figura 41 Variação da composição dos licores em GOS ($\text{g}/100\text{g Gn}$) em função do $\text{Log } R_0$ resultantes dos ensaios de auto-hidrólise da casca de pinhão; casca de caroço de pêssego; BAE e sementes de anona..... | 70 |
| Figura 42 Variação da composição dos licores em XOS ($\text{g}/100\text{g Xn}$) em função do $\text{Log } R_0$ resultantes dos ensaios de auto-hidrólise da casca de pinhão; casca de caroço de pêssego; BAE e sementes de anona..... | 71 |
| Figura 43 Variação da composição dos OS em grupos acetilo ($\text{g}/100\text{g Ac}$) em função do $\text{Log } R_0$ resultantes dos ensaios de auto-hidrólise da casca de pinhão; casca de caroço de pêssego; BAE e sementes de anona..... | 72 |
| Figura 44 Perfis de pressão (Bar) em função da temperatura (K), obtidos nos ensaios de auto-hidrólise de: A) casca de pinhão; B) Casca de caroço de pêssego; C) Sementes de anona e D)BAE..... | 74 |
| Figura 45 Correlação das variações de pressão obtidas, entre os ensaios de auto-hidrólise e os ensaios com água, em função da concentração de compostos voláteis (g/L) presentes nos licores de A) Casca de pinhão; B) Casca de caroço de pêssego; C) BAE e D) Sementes de anona..... | 75 |

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 46 Composição dos resíduos sólidos (g/100g material seco) obtidos nos ensaios de auto-hidrólise da casca de pinhão (A), casca de caroço de pêssego (B), BAE (C) e das sementes de anona (D), em função do Log R_0 | 76 |
| Figura 47 Ajuste do modelo proposto (- - -) aos dados experimentais obtidos para a casca de caroço de pêssego | 80 |
| Figura 48 Ajuste do modelo proposto (- - -) aos dados experimentais obtidos para o BAE (mol/L) em função do tempo | 81 |
| Figura 49 Variação do valor da constante de velocidade de reação (h^{-1}) para a casca de pinhão, casca de caroço de pêssego, BAE e sementes de anona, em função da temperatura (K)..... | 81 |
| Figura 50 Relação entre a energia de ativação (kJ/mol) e do teor em grupos acetilo (g/100g MP) presentes em cada material | 82 |
| Figura 51 Perfil das concentrações dos oligossacarídeos, presentes nos licores da casca de pinhão (A), da casca do caroço de pêssego (B), do BAE (C) e das sementes de anona (D), em função do tempo de armazenamento (semanas) à temperatura ambiente..... | 84 |
| Figura 52 Razão entre a concentração de furfural (A) e ácido acético (B) e a concentração de xilose, presente no licor, produzido nas condições ótimas, para a casca de pinhão, casca de caroço de pêssego, BAE e sementes de anona, antes e após liofilização | 85 |
| Figura 53 Estabilidade a 100°C dos A) GOS e B) XOS de casca de pinhão, casca de caroço de pêssego, BAE e sementes de anona, em função do pH | 86 |
| Figura 54 Estabilidade a 37°C dos A) GOS e B) XOS de casca de pinhão, casca de caroço de pêssego, BAE e sementes de anona, em função do pH | 88 |
| Figura 55 Concentração relativa de glucose obtida nos ensaios de hidrólise enzimática de (A) casca de pinhão, (B) casca de caroço de pêssego, (C) BAE e (D) sementes de anona, em função do Log R_0 | 89 |
| Figura 56 Rendimento em glucose relativo obtido nos ensaios de hidrólise enzimática de (A) casca de pinhão, (B) casca de caroço de pêssego, (C) BAE e (D) sementes de anona, em função do Log R_0 | 90 |
| Figura 57 Relação entre a variação do rendimento em glucana (%) obtido após hidrólise enzimática em função da quantidade de hemicelulose removida durante o processo de auto-hidrólise da casca de pinhão, casca de caroço de pêssego, BAE e das sementes de anona | 91 |
| Figura 58 Reator piloto para auto-hidrólise disponível no LNEG | 97 |

Lista de quadros

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Quadro 1 Principais polímeros constituintes das hemiceluloses das espécies de folhosas, resinosas, gramíneas e cereais. Adaptado de (Gírio <i>et al.</i> 2010). | 4 |
| Quadro 2 Classificação, estrutura e grau de polimerização das diferentes classes de NDOS. Adaptado de (Crittenden and Playne 1996) | 10 |
| Quadro 3 Preparação das soluções tampão para a avaliação da estabilidade dos oligossacarídeos e respectivas soluções usadas na sua preparação..... | 29 |
| Quadro 4 Características das colunas cromatográficas HPX-87H e HPX-87P e respectivas condições operacionais de análise..... | 34 |
| Quadro 5 Características da coluna cromatográfica BIOSEP – SEC – S400 e respectivas condições operacionais de análise..... | 35 |
| Quadro 6 Condições de operação utilizadas na eletroforese capilar de zona..... | 36 |
| Quadro 7 Preparação dos ensaios enzimáticos para determinar as atividades enzimáticas de FPase, celobiase e endoglucanase | 37 |
| Quadro 8 Densidade aparente e real das frações selecionadas para cada um dos materiais utilizados neste trabalho | 42 |
| Quadro 9 Caracterização química dos materiais (g/100g de material seco) | 44 |
| Quadro 10 Valores do fator de severidade, $\text{Log } R_0$, para os ensaios de auto-hidrólise realizados neste trabalho | 47 |
| Quadro 11 Teor relativo/comparativo dos fenóis identificados por CZE nos licores de auto-hidrólise da casca de pinhão ao longo das condições de severidade testadas | 55 |
| Quadro 12 Teor relativo/comparativo dos fenóis identificados por CZE nos licores de auto-hidrólise da casca de caroço de pêssago ao longo das condições de severidade testadas..... | 61 |
| Quadro 13 Teor relativo/comparativo dos fenóis identificados por CZE nos licores de auto-hidrólise do BAE ao longo das condições de severidade testadas | 66 |
| Quadro 14 Parâmetros determinados para o modelo proposto para os diferentes materiais.... | 80 |
| Quadro 15 Concentração em glucose (g/L) e rendimento em glucana (%) obtidos nos ensaios enzimáticos dos materiais não tratados | 88 |
| Quadro 16 Preparação da curva de calibração do método do DNS | 109 |

Enquadramento

Este trabalho foi realizado na Unidade de Bioenergia (UB) do Laboratório Nacional de Energia e Geologia (LNEG), no âmbito dos projetos “RefinOlea” financiado pelo QREN e “SSAD - Desconstrução de Biomassa utilizando Superácidos sólidos” (PTDC/AGR-ALI/122261/2010) financiado pelo programa FEDER (Programa Operacional Fatores de Competitividade – COMPETE) e ainda por fundos nacionais (Fundação para a Ciência e Tecnologia).

No primeiro capítulo desta dissertação faz-se a apresentação do conceito de biorrefinaria, como uma alternativa para a valorização de materiais lenhocelulósicos. Descreve-se ainda o papel importante que os oligossacarídeos (OS) têm, como produtos de elevado valor acrescentado derivados das hemiceluloses (no âmbito daquele mesmo conceito), discutindo-se os principais processos de obtenção dos mesmos. Também são apresentados quatro subprodutos agroindustriais - cascas de pinhão, cascas de caroço de pêssigo, bagaço de azeitona e sementes de anona e é discutido o seu potencial para a produção de OS.

O segundo capítulo descreve os métodos experimentais utilizados, fazendo-se a descrição da preparação dos materiais, do respetivo processamento hidrotérmico e dos principais métodos analíticos utilizados.

No terceiro capítulo apresentam-se e discutem-se os principais resultados obtidos. São apresentados resultados relativos aos tratamentos físicos das cascas de pinhão e pêssigo – materiais que necessitaram de cominuição prévia à sua utilização ao contrário dos outros dois materiais estudados. Apresentam-se também, os resultados relativos ao efeito da auto-hidrólise no material, descrevendo inicialmente, a evolução da composição dos licores, com especial destaque para os principais produtos encontrados, os OS. Também são apresentados e discutidos os principais métodos de modelização cinética do processo de auto-hidrólise. Os OS produzidos são caracterizados quimicamente quanto à sua estabilidade e discutidos quanto à sua aplicabilidade comercial. Ainda neste capítulo é discutida a utilização de leituras de pressão como base para um sistema de controlo *on-line* do processo de auto-hidrólise. Discute-se ainda o efeito deste processo na composição química do material sólido remanescente após o tratamento, bem como, a sua digestibilidade enzimática e o seu potencial de valorização no âmbito da biorrefinaria, nomeadamente para a produção de etanol por via fermentativa dos monossacarídeos de glucose, resultantes da hidrólise enzimática da celulose.

Para finalizar, no quarto capítulo, são apresentadas as principais conclusões e sugestões para trabalho futuro.

1 Introdução

A utilização do petróleo na indústria, durante o século XIX, proporcionou grande disponibilidade de energia e matérias-primas, o que ajudou a industrializar o mundo e a melhorar as condições de vida de países em desenvolvimento. Contudo, o petróleo, como matéria-prima de natureza fóssil não renovável, tem uma disponibilidade limitada. Para além disso, o atual elevado preço do petróleo e o impacto ambiental negativo que a sua utilização produz, nomeadamente ao nível da produção de gases de efeito de estufa, colocam em cima da mesa das prioridades mundiais a necessidade de se encontrarem alternativas que permitam o desenvolvimento de um modelo económico sustentável, usando matérias-primas renováveis e utilizando processos não-poluentes.

Assim a biomassa surge como principal alternativa ao petróleo por estar disponível ou poder ser produzida em grandes quantidades de forma renovável, para além de que a intensificação da sua produção/utilização é um processo tendencialmente neutro em termos de emissões de gases de efeito de estufa.

1.1 Biomassa e biorrefinarias

O termo Biomassa é definido como qualquer fração de matéria orgânica renovável disponível na natureza e inclui diferentes tipos de materiais tais como: madeira e plantas, resíduos florestais e urbanos, culturas agrícolas e silvícolas, subprodutos industriais ou “restos” e excrementos de animais. De entre estes, a biomassa de origem vegetal, como biomassa primária, é a mais interessante para ser utilizada como matéria-prima para a produção de novos materiais e energia.

Estima-se que a produção anual de biomassa vegetal na Terra seja de $1,7 \times 10^{11}$ toneladas, onde apenas são utilizadas cerca de 6×10^9 toneladas. De entre a restante biomassa geralmente desperdiçada, encontram-se os resíduos industriais e agroindustriais de natureza lenhocelulósica (Carvalho *et al.* 2008) que constituem cada vez mais um problema ambiental. Para tal, o aproveitamento destes resíduos deve garantir a produção de produtos de valor acrescentado bem como a sustentabilidade ambiental. No entanto, o seu processamento industrial impõe algumas dificuldades, pelo que recentemente surgiu um novo conceito, a biorrefinaria.

Uma característica distinta das biorrefinarias é o facto de utilizar biomassa vegetal bastante diversificada, constituída por diversas frações, de composição química muito variada, o

que constitui importantes desafios no que diz respeito à inovação, permitindo a sua utilização de forma eficiente.

A biorrefinaria é uma instalação industrial que procura a utilização integral da biomassa de forma sustentável, para a produção simultânea de biocombustíveis, energia, materiais e produtos químicos (Figura 1), usando processos de conversão química, bioquímica e/ou termoquímica (Carvalho *et al.* 2008)

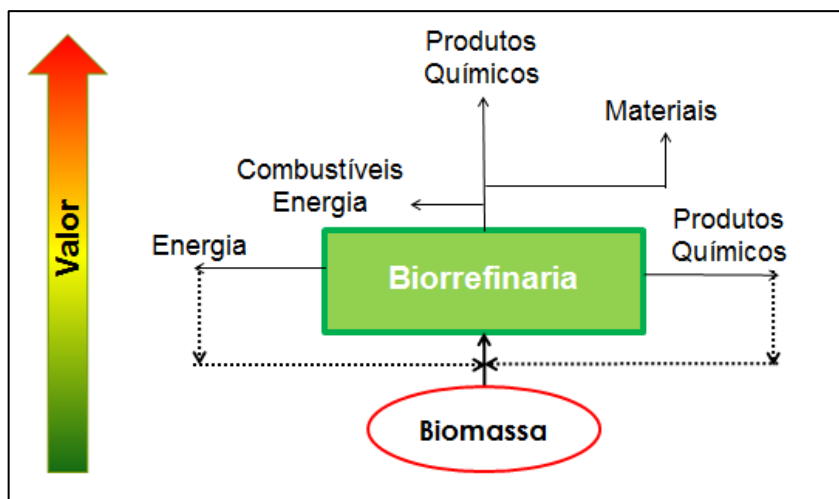


Figura 1 Ilustração do conceito de biorrefinaria. Adaptado de (Carvalho *et al.* 2008)

A plataforma bioquímica foca-se na fermentação dos hidratos de carbono extraídos da biomassa. A plataforma termoquímica baseia-se na gasificação (aquecimento da biomassa com cerca de 1/3 do oxigénio necessário para a combustão completa, produzindo gás de síntese) e/ou pirólise (aquecimento da biomassa na ausência de oxigénio, produzindo óleo de pirólise) (Oliveira *et al.* 2009).

O desenvolvimento das biorrefinarias passa pelo aperfeiçoamento dos processos bioquímicos e termoquímicos envolvidos e no estabelecimento da interação entre ambos, alargando assim as fontes de matéria-prima utilizáveis e permitindo a sua valorização de forma eficiente. Sistemas de biorrefinaria já estão operacionais à escala de demonstração, contudo, ainda necessitam de desenvolvimento.

Neste trabalho, a maximização do aproveitamento dos materiais lenhocelulósicos (ML), passa também pelo fracionamento e pela recuperação das hemiceluloses na forma de OS.

1.2 Materiais lenhocelulósicos

Tomam a designação de ML os diferentes tipos de biomassa de origem vegetal que têm como característica comum serem fundamentalmente constituídos por polímeros de alto

peso molecular, os quais constituem a parede celular das células vegetais como os polissacarídeos (celulose e hemicelulose) e as lenhinas (Fengel *et al.* 1983).

Os ML são classificados fundamentalmente em três grandes grupos: resinosas ou coníferas (na literatura em inglês designadas como *softwoods*), folhosas ou de folha caduca (na literatura em inglês designadas como *hardwoods*) e plantas gramíneas (maioritariamente os cereais). Há, no entanto, diferenças muito significativas na composição destes materiais, por exemplo no que diz respeito ao tipo de polissacarídeos que constituem as hemiceluloses e à sua abundância, à estrutura da lenhina, bem como diferenças da sua composição em compostos de baixo peso molecular, tais como os extratáveis e a cinza.

1.2.1 Composição dos materiais lenhocelulósicos

1.2.1.1 Celulose

A celulose $[(C_6H_{10}O_5)_n]$ é o principal constituinte das plantas, conferindo-lhes rigidez e forma. É um homopolissacarídeo linear composto por unidades de β -D-glucopiranoose que estabelecem entre si ligações glicosídicas β -1,4, dando origem a cadeias longas. O grau de polimerização, isto é, o número de unidades de glucose que compõem uma molécula de celulose, pode variar entre 5000 e 10000 unidades na celulose nativa da madeira (Goldstein 1991, Sjöström 1993).

Os grupos hidroxilo de cada molécula de glucose são responsáveis pela organização das estruturas supramoleculares e pelo comportamento físico e químico da celulose. A regularidade espacial dos grupos hidroxilo e o envolvimento destes em pontes de hidrogénio favorece a coesão entre cadeias e permite a formação de estruturas supramoleculares organizadas (Okamora 1990).

A elevada organização supramolecular e o elevado grau de polimerização da celulose manifestam-se na sua insolubilidade na maior parte dos solventes orgânicos, sendo responsável pela rigidez, densidade, entre outras propriedades mecânicas tanto da madeira como de fibras de pastas.

1.2.1.2 Hemiceluloses

As hemiceluloses são heteropolissacarídeos que podem ser constituídos por combinações de cinco açúcares neutros, três hexoses (D-(+)-glucose, D-(+)-manose e D-(+)-galactose) e duas pentoses (D-(+)-xilose e L-(+)-arabinose), por ácidos urónicos (ácidos D-glucurónico, α -D-4-metilglucurónico e α -D-galacturónico) e grupos acetilo. Podem ainda estar presentes açúcares como L-Ramnose e L-Fucose. O grau de polimerização das hemiceluloses é muito

inferior ao da celulose, variando entre 100 e 200 para as folhosas e 70 a 130 para as resinosas (Fengel and Wegener 1983, Goldstein 1991).

No que diz respeito à natureza e à abundância, existem diferenças entre as hemiceluloses das resinosas e folhosas, apresentando as folhosas uma maior percentagem de hemiceluloses (24-40%) do que as resinosas (25-35%) (Sun *et al.* 2002). Nas folhosas, as hemiceluloses predominantes são as xilanas e as xiloglucanas (XGs) mas também estão presentes, apesar de em menores quantidades, as glucomananas. As principais hemiceluloses presentes nas resinosas são as galactoglucomananas, contendo também algumas xilanas (arabino-4-*O*-metilglucuroxilana) (Sun and Cheng 2002). O Quadro 1 apresenta resumidamente os tipos maioritários de polímeros constituintes das hemiceluloses para cada tipo de ML, revendo-se seguidamente, os tipos mais comuns.

Quadro 1 Principais polímeros constituintes das hemiceluloses das espécies de folhosas, resinosas, gramíneas e cereais. Adaptado de (Gírio *et al.* 2010).

| Origem biológica | Tipo de hemicelulose | Quantidade (% em biomassa seca total) | Cadeia principal | Cadeias laterais | Tipo de ligação |
|---------------------|-----------------------|---------------------------------------|------------------|----------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------|
| Folhosas | Xiloglucanas | 2-25 | D-Glcp D-Xylp | D-Xilose D-Galactose L-Arabinose L-Fucose Grupos acetilo | β -(1→4) α -(1→3) β -(1→2) α -(1→2) α -(1→2) |
| | Glucuroxilanas | 15-30 | D-Xylp | ác. 4- <i>O</i> -metilglucurónico Grupos acetilo | α -(1→2) |
| | Glucomananas | 2-5 | D-Manp D-Glcp | D-Galactose | α -(1→6) |
| Resinosas | Galactoglucomananas | 10-25 | D-Manp D-Glcp | D-Galactose Grupos acetilo | α -(1→6) |
| | Arabinoglucuroxilanas | 5-10 | D-Xylp | ác. 4- <i>O</i> -metilglucurónico L-Arabinose | α -(1→2) α -(1→3) |
| | Glucomananas | 2-5 | D-Manp D-Glcp | D-Galactose | α -(1→6) |
| Gramíneas e cereais | Arabinoxilanas | 15--30 | D-Xylp | Resíduos do ácido ferúlico | α -(1→2) α -(1→3) |
| | Glucuroarabinoxilanas | 15-30 | D-Xylp | L-Arabinose ác. 4- <i>O</i> -metilglucurónico Acetil | α -(1→2) α -(1→3) |

Xylp = Xilopiranose; Manp = Manopiranose; Glcp = Glucopiranose; Grupos acetilo = grupos OH acetilados e ác. = ácido

Xilanas

As xilanas mais comuns são formadas por uma cadeia principal de xilose ligada por ligações β -1,4.

As *O*-acetil-4-*O*-metilglucurono- β -D-xilanas ou glucuroxilanas (Figura 2) são as principais hemiceluloses das madeiras folhosas. São polissacarídeos de cadeia linear constituídos por unidades de D-xilopirranose unidas por ligações glicosídicas β -1,4. A cadeia principal apresenta com elevada frequência substituições laterais nos grupos OH em C₂ ou C₃ por grupos acetilo: cerca de 7 em cada 10 unidades de xilose. A intervalos irregulares, em C-2 também ocorre ligação glicosídica α -(1 \rightarrow 2) com o ácido 4-*O*-metil- α -D-glucurônico, o qual se encontra distribuído irregularmente. A frequência deste ácido urônico é de cerca de 1 por cada 10 unidades de xilose (Fengel and Wegener 1983, Sjöström 1993). O grau de polimerização médio varia entre 100 e 200, dependendo da espécie da madeira. Além das unidades principais já referidas, as xilanas das folhosas também contêm pequenas quantidades de L-ramnose e ácido galacturônico.

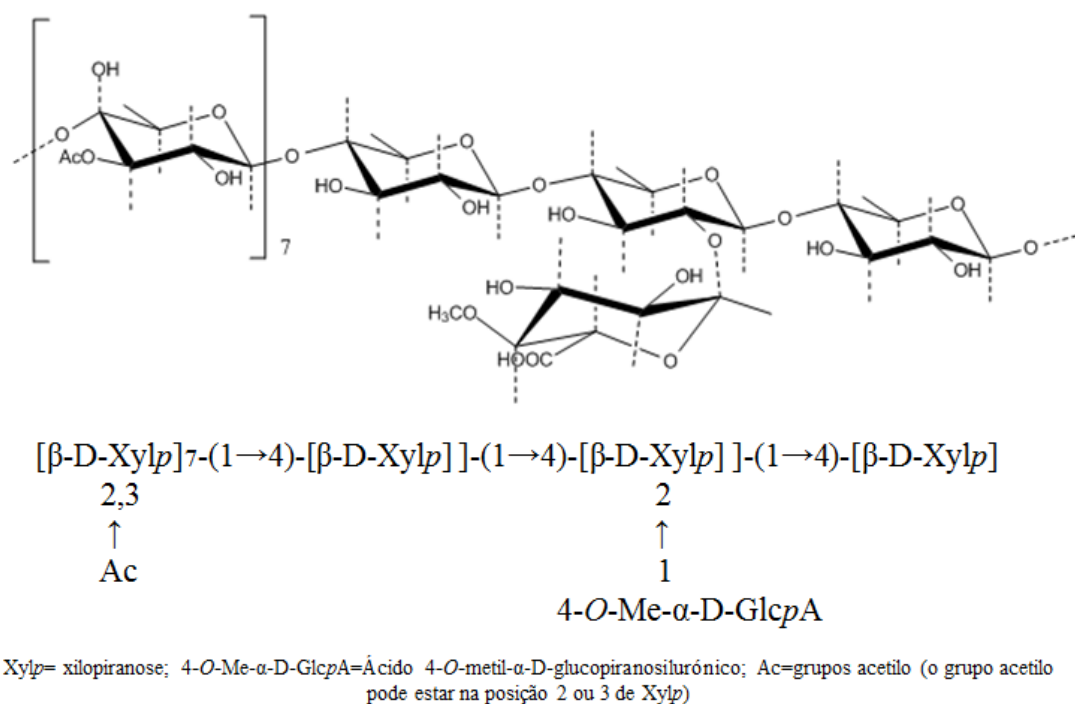


Figura 2 Representação estrutural esquemática das hemiceluloses mais comuns presentes nas folhosas: *O*-acetil-metilglucuronoxilana [adaptado de (Fengel and Wegener 1983, Sjöström 1993)]

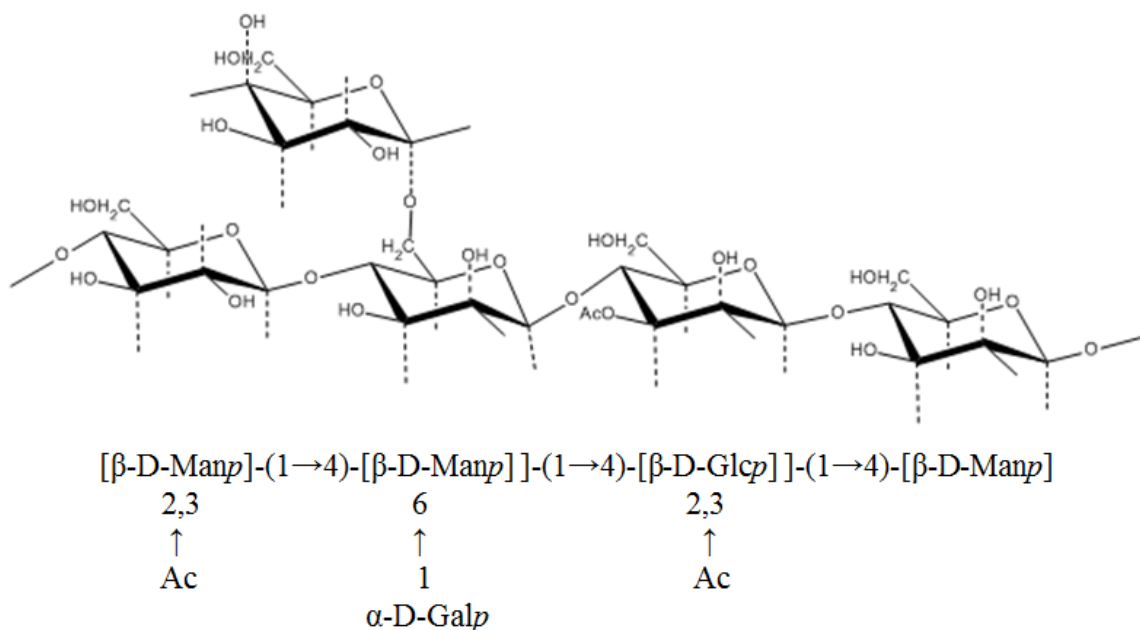
As L-Arabino-4-*O*-metilglucuronoxilanas ou arabinoglucuronoxilanas são uma das classes de hemiceluloses presentes nas madeiras resinosas. Consistem numa cadeia linear de unidades D-xilopirranose unidas por ligações glicosídicas β -1,4 que contém unidades de ácido

4-*O*-metil- α -D-glucurónico e L-arabinofuranose unidos por ligações glicosídicas α -1,2 e α -1,3 respetivamente (Timell 1963). Ao contrário das xilanas das folhosas, nas resinosas não estão presentes grupos acetilo (Laine 2005). Estas hemiceluloses também podem conter pequenas quantidades de L-ramnose e ácido galacturónico e o seu grau de polimerização médio varia entre 50 e 185 (Sjöström 1993). As arabino-4-*O*-metilglucuronoxilanas também estão presentes em materiais não-lenhosos e normalmente apresentam semelhanças com as xilanas das madeiras folhosas mas com maiores quantidades de L-arabinose (Sjöström 1993).

As arabinoxilanas têm sido identificadas em vários cereais como o trigo, o centeio, a cevada, aveia, arroz, milho e sorgo, bem como, em outras plantas, como rebentos de bambu e ervas. Representam o principal componente hemicelulósico das paredes celulares do endosperma das amiláceas e das camadas externas dos grãos de cereais (Ebringerová *et al.* 2005).

Glucomananas

As *O*-acetil-galactoglucomananas ou galactoglucomananas são as principais hemiceluloses das madeiras resinosas. São constituídas por uma cadeia linear de unidades D-glucopirranose e D-manopirranose, unidas por ligações glicosídicas β -1,4, parcialmente acetiladas nos carbonos C2 ou C3 e substituída por unidades D-galactopirranose unidas por ligações α -1,6 à glucose e manose (Pereira *et al.* 2003). O grau de polimerização médio deste tipo de hemiceluloses varia entre 40 e 100 (Sjöström 1993). As glucomananas também estão presentes nas madeiras folhosas e possuem uma cadeia linear de unidades D-glucopiranosilo e D-manopiranosilo, unidas por ligações glicosídicas β -1,4, mas não são acetilados. A razão glucose: manose é 1:1-2 e o grau de polimerização médio varia entre 40 e 70 (Alén 2000).



Manp= manopirranose; Glcp= glucopirranose; Galp= galactopirranose; Ac=grupos acetilo (um grupo acetilo na posição 2 ou 3 de Manp ou Glcp por cada 3 a 4 unidades de hexose)

Figura 3 Representação estrutural simplificada das hemiceluloses mais comuns presentes nas resinosas: as *O*-acetil-galactoglucomana [adaptado de (Fengel and Wegener 1983, Sjöström 1993)]

β-glucanas

As β-glucanas são componentes de hemicelulose existentes nos grãos de cereais e são a principal classe de hemiceluloses associadas às microfibrilas de celulose durante o crescimento celular. Também estão presentes nos tecidos não-endospermicos de plantas gramíneas. As β-glucanas são polissacarídeos ramificados que contêm ligações glicosídicas de β-(1→3) (70%) e de β-(1→4) (30%) (Ebringerová *et al.* 2005).

Xiloglucanas

As xiloglucanas (XG) constituem cerca de 20-25% da parede celular das angiospérmicas dicotiledóneas, 2-5% das angiospérmicas monocotiledóneas e cerca de 10% das paredes celulares dos abetos (gimnospérmicas). As XG são constituídas por uma cadeia linear de unidades D-glucopirranose, unidas por ligações glicosídicas β-1,4 com resíduos de D-Xilopirranose na posição 6 (Ebringerová *et al.* 2005).

1.2.1.3 Lenhina

A seguir à celulose, a lenhina é o componente mais abundante e importante das células vegetais, correspondendo a 25-30% da sua parede celular (Pereira *et al.* 2003) e é responsável pela coesão das fibras nas madeiras (Pinto *et al.* 2005). A lenhina apresenta uma estrutura

amorfa e complexa, constituída por unidades precursoras fenilpropano, unidas por ligações éter e carbono-carbono (Fengel and Wegener 1983).

Os álcoois *p*-cumarílico, coniferílico e sinapílico (Figura 4) são os precursores biossintéticos da lenhina que diferem entre si somente no número de grupos metoxilo substituintes. O conhecimento destes precursores da lenhina permitiu compreender a sua natureza aromática, bem como, os tipos de ligações predominantes.

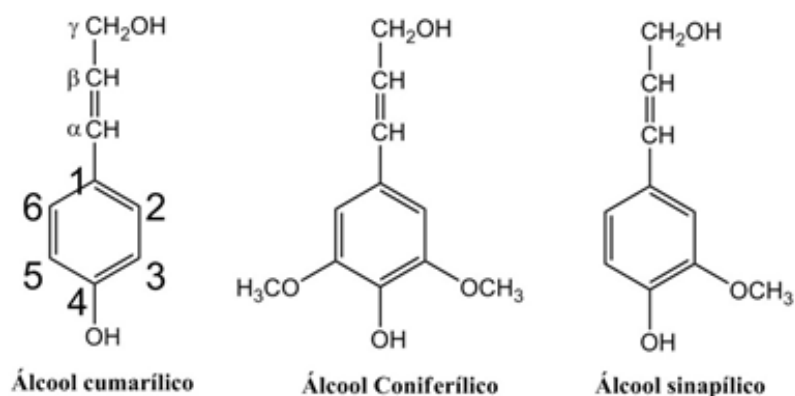


Figura 4 Álcoois precursores da lenhina: álcool *p*-cumarílico; álcool coniferílico e álcool sinapílico

Os tipos de unidades aromáticas que constituem a lenhina são designados de *p*-hidroxifenilo (H), guaiacilo (G) e siringilo (S) (Fengel and Wegener 1983) e a natureza destas unidades varia de acordo com a espécie vegetal. As lenhinas das resinosas são constituídas essencialmente por unidades G, enquanto as lenhinas das folhosas são compostas por unidades S e G em proporções variáveis. As lenhinas das gramíneas apresentam quantidades variáveis das três unidades (Pereira *et al.* 2003). A frequência de cada unidade estrutural e o tipo de ligação entre elas, são fatores que conduzem às diferenças entre espécies próximas (Pinto *et al.* 2010).

A ligação que predomina, entre os precursores da lenhina é a β -O-4 (40-50% nas resinosas e 50-60% nas folhosas) (Pereira *et al.* 2003).

A lenhina tem propriedades notáveis (Lora *et al.* 2002), oferecendo a possibilidade da sua utilização em diversas aplicações. Considerando o conceito de biorrefinaria, têm sido desenvolvidos diferentes processos de onde se destacam os processos oxidativos para a conversão da lenhina em compostos fenólicos de alto valor acrescentado (Pinto *et al.* 2010).

1.2.1.4 Extratáveis

Os extratáveis, apesar de representarem uma pequena fração na composição dos ML, englobam variadíssimos compostos de onde se podem destacar os terpenóides, os compostos fenólicos (flavonoides, taninos ou outros), ésteres de ácidos gordos e alcaloides (Fengel and Wegener 1983, Pereira *et al.* 2003).

O teor de extratáveis pode variar entre 0% a 20% (em massa seca) dos ML, constituindo até 8% da massa seca das resinosas e até 20% das folhosas (Trugilho *et al.* 1996). A maior parte dos extratáveis são metabolitos secundários, importantes no desenvolvimento e crescimento celular e na defesa contra ataques microbianos (Alén 2000, Gírio *et al.* 2010).

O facto das hemiceluloses dos ML terem composição química muito variada, constitui um importante desafio no que diz respeito à sua valorização numa biorrefinaria. Uma forma de valorizar essa diversidade é através da produção de OS. Especificamente, neste trabalho, pretende-se obter OS a partir de novas fontes de biomassa com o intuito de obter OS com diferentes propriedades.

1.3 Oligossacarídeos como produtos de valor acrescentado das biorrefinarias

1.3.1 Definição, propriedades aplicações e mercado

Há uma grande diversidade de definições para OS. Para a IUPAC, os OS são hidratos de carbono hidrolisáveis, de baixa massa molar, constituídos por unidades monossacarídicas (entre 2 a 10) ligadas entre si por ligações glicosídicas (IUPAC-IUB 1982, Crittenden *et al.* 1996, Voragen 1998). As ligações glicosídicas ocorrem sempre entre o carbono anomérico de uma unidade monossacarídica e o grupo hidroxilo de outra unidade. No entanto, na literatura, muitos autores (John *et al.* 1982, Koizumi *et al.* 1985, Nilsson *et al.* 2005) definem os OS como hidratos de carbono com um DP (grau de polimerização) mais elevado, ou seja, como hidratos de carbono constituídos por unidades monossacarídicas entre 2 e 60, desde que apresentem propriedades alimentares funcionais.

Os OS apresentam características físico-químicas que os tornam úteis na indústria alimentar, por exemplo, a capacidade de reter a humidade dos alimentos (humectantes). São solúveis em água e ligeiramente mais doces que a sacarose. Têm baixo valor calórico (1,5-2,0 kcal/g), podendo ser utilizados em dietas para indivíduos com diabetes. Os OS apresentam outras vantagens, ao serem estáveis a uma gama larga de pH (entre 2.5 e 8) e a temperaturas elevadas (até 100°C) e ao resultarem num abaixamento crioscópico (até -10°C), sendo

indicados para bebidas carbonadas e no processamento de alimentos (Vázquez *et al.* 2000). Para além disso, quando comparados com mono- e dissacarídeos, o elevado peso molecular dos OS torna-os agentes espessantes eficazes, realçando o sabor dos alimentos e causando uma boa sensação na boca (Voragen 1998, Mussato *et al.* 2007).

De entre os OS com elevado interesse alimentar/diatético e económico destacam-se os OS não digeríveis (NDOS), cuja principal característica é a presença de unidades monossacarídicas não hidrolisáveis pela atividade das enzimas digestivas presentes nos humanos (Mussato and Mancilha 2007). Estas unidades não digeríveis servem de alimento para bactérias que fazem parte da flora intestinal, tais como as bifidobactérias e as bactérias lácticas (Giese *et al.* 2011), pelo que alguns NDOS podem também ser denominados como prébióticos (Mussato and Mancilha 2007). No Quadro 2 estão apresentadas as classes dos NDOS mais representativas existentes no mercado, bem como o tipo de ligação, a composição e o DP correspondente.

Quadro 2 Classificação, estrutura e grau de polimerização das diferentes classes de NDOS. Adaptado de (Crittenden and Playne 1996)

| Fonte | Classificação | Tipo de ligação e composição | DP |
|----------|--------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------|--------|
| Lactose | Galacto-oligossacarídeos | α -D-Glc-(1→4)(β -D-Gal-(1→6) _n) | 2 a 5 |
| | Lactulose | β -D-Gal-(1→4)- β -D-Fru | 2 |
| Sacarose | Lacto-sacarose | β -D-Gal-(1→4)- α -D-Glc-(1→2)- β -D-Fru | 3 |
| | Oligossacarídeos de palatinose | (α -D-Glc-(1→6)-D-Fru) _n | 4 a 8 |
| Inulina | Fruto-oligossacarídeos | α -D-Glc-(1→2)(β -D-Fru-(1→2) _n) | 2 a 4 |
| | | β -D-Fru-(1→2)-(β -D-Fru-(1→2) _n) | 2 a 9 |
| | | α -D-Fru-(1→2)-(β -D-Fru-(1→2) _n) | 2 a 10 |
| Amido | Malto-oligossacarídeos | (α -D-Glc-(1→4)) _n | 2 a 5 |
| | Gentio-oligossacarídeos | (β -D-Glc-(1→6)) _n | 2 a 5 |
| | Isomalto-oligossacarídeos | (α -D-Glc-(1→6)) _n | 2 a 5 |
| | Ciclodextrinas | (α -D-Glc-(1→4)) _n | 6 a 12 |
| Xilanas | Xilo-oligossacarídeos | (β -Xyl-(1→4)) _n | 2 a 9 |
| Pectina | Oligossacarídeos da soja | (α -D-Gal-(1→6)) _n - α -D-Glc-(1→2)- β -D-Fru | 3a4 |

DP: Grau de polimerização

Os OS também são muito utilizados na indústria farmacêutica pois funcionam como reguladores de substrato das principais vias metabólicas e como agentes imunomoduladores (Mussato and Mancilha 2007)(Vázquez, Alonso et al. 2000/11), podendo ser utilizados em processos biológicos de reconhecimento, como infeções virais e bacterianas, adesão celular, transdução de sinais e comunicações intercelulares (Giese *et al.* 2011).

O mercado dos OS é atualmente um mercado importante, mas ainda em expansão. É dominado pelos NDOS derivados da lactose, dos quais os principais são os galacto-

oligossacarídeos (GalOS) e a lactulose, seguido dos fruto-oligossacarídeos (FOS). Em 1996, os xilo-oligossacarídeos (XOS), representavam menos de 1% do mercado mundial, contudo a sua procura tem vindo a aumentar (Nakakuki 2002, Barreteau *et al.* 2006).

1.3.2 Métodos de produção de OS

Atualmente, os OS são produzidos a partir de diversas matérias-primas, como a lactose, o amido, a inulina, a sacarose, as xilanas e a pectina, recorrendo a diversos métodos. Os OS podem ser obtidos através de síntese (química ou enzimática) ou da despolimerização (física, química ou enzimática) de polissacarídeos (Giese *et al.* 2011).

O uso de enzimas para modificar polissacarídeos e ampliar o seu potencial de aplicação biotecnológica representa uma alternativa interessante devido à alta especificidade destas proteínas em relação aos seus substratos. De entre as reações enzimáticas utilizadas na obtenção de OS têm-se destacado as reações de hidrólise, transglicosilação e isomerização. Por exemplo, a partir da lactose, por isomeração em pH alcalino, é produzida a lactulose (Mussato and Mancilha 2007). Os FOS podem resultar da hidrólise enzimática da inulina, utilizando a inulinase (Crittenden and Playne 1996). Os XOS são obtidos por hidrólise enzimática (pela ação das xilanasas) do carolo de milho (Crittenden and Playne 1996) e de outros subprodutos agroindustriais, tais como derivados da mandioca e da cana-de-açúcar (Giese *et al.* 2011).

A síntese catalisada por enzimas representa uma alternativa interessante aos métodos químicos clássicos por permitir o controlo da regioseletividade e da estereoquímica dos produtos finais de reação (Perugino *et al.* 2004). Este processo envolve duas classes de enzimas, as glicosidases e as glicosiltransferases, e tem contribuído para a obtenção de oligossacarídeos difíceis de serem produzidos pelos métodos convencionais de despolimerização e hidrólise enzimática (Shoda *et al.* 1998). Um exemplo é a obtenção de FOS por síntese enzimática a partir da sacarose e a obtenção de GalOS por síntese enzimática a partir da lactose (Mussato and Mancilha 2007).

Contudo, o rendimento destas reações catalisadas por glicosidases e glicosiltransferases é baixo, devido à possibilidade de reversão da reação, que promove não só a glicosilação, como também a hidrólise dos produtos formados. Assim, recentemente a necessidade do desenvolvimento de novos alimentos/ingredientes alimentares funcionais impulsionou o estudo e a utilização de novos processos biotecnológicos na obtenção de OS, visto que a procura tem vindo a aumentar gradativamente devido às suas propriedades peculiares.

Como alternativa a estes métodos enzimáticos, a auto-hidrólise é descrita na literatura, como um bom método de produção de XOS a partir de vários subprodutos agroindustriais, como a

dreche cervejeira, *Arundo donax* e resíduos de milho (caule e folhas) (Carvalho *et al.* 2004, Caparrós *et al.* 2007, Nabarlatz *et al.* 2007, Moniz *et al.* 2009).

Dentro do âmbito das biorrefinarias, os principais métodos que permitem a produção de OS são a hidrólise ácida e os métodos hidrotérmicos (Carvalho *et al.* 2008), sendo estes últimos os mais eficientes, como se verá seguidamente.

1.3.2.1 Métodos hidrotérmicos

Os métodos hidrotérmicos compreendem essencialmente dois processos que consistem na utilização de calor e água (auto-hidrólise) ou calor e vapor (explosão com vapor). O objetivo de ambos os processos é hidrolisar substancialmente a fração hemicelulósica, sem a necessidade de recorrer a catalisadores ácidos, tornando estes processos económica e ambientalmente sustentáveis.

1.3.2.1.1 Auto-hidrólise

O processo de auto-hidrólise utiliza como reagentes apenas água e biomassa, sob condições operacionais variáveis. Para além disso, a auto-hidrólise é realizada a temperaturas baixas e, devido ao pH moderado, os problemas de corrosão dos equipamentos são reduzidos (Gírio *et al.* 2010). O processo de auto-hidrólise é caracterizado pelos elevados rendimentos (acima dos 80%) na recuperação da fração hemicelulósica, sob a forma de OS.

A lenhina e a celulose não são significativamente afetadas, obtendo-se um resíduo sólido rico nestes dois componentes, facilmente recuperável e valorizável, por exemplo para a produção de etanol celulósico (Carvalho *et al.* 2008, Gírio *et al.* 2010).

O processo de auto-hidrólise (utilizado neste trabalho) inicia-se com a despolimerização das hemiceluloses, por hidrólise seletiva dos seus grupos acetilo e das ligações glicosídicas pela ação catalisadora dos iões hidrónio (H_3O^+) provenientes da auto-ionização da água. Numa segunda fase do processo, os H_3O^+ provenientes do ácido acético também atuam como catalisadores, favorecendo a cinética da reação. Ultimamente tem sido sugerido que os ácidos urónicos também possam contribuir para a formação dos H_3O^+ , embora o seu papel na hidrólise ainda não esteja completamente explícito (Gírio *et al.* 2010).

1.3.2.1.2 Explosão com vapor

No processo por explosão com vapor, o vapor condensa, durante um curto período (de segundos a minutos) sob altas pressões (20-50 bar), “molhando” assim o material (Gírio *et al.* 2010). Após decorrido o tempo de operação esperado, o material é sujeito a uma descompressão súbita no reator, provocando a vaporização da água contida nas fibras, resultando numa explosão. As forças que resultam desta descompressão provocam a

desintegração da matriz lenhocelulósica, conduzindo à quebra de ligações intra- e intermoleculares (Carrasco 1989). Alguns estudos revelaram que a baixas temperaturas e longos tempos de residência, o processo de explosão com vapor é mais favorável (Sun and Cheng 2002).

1.3.2.2 Hidrólise ácida

O processo de hidrólise ácida pode ser dividido em dois grupos consoante a concentração do ácido, isto é, diluído (necessita de temperaturas elevadas) e concentrado (realizado a temperaturas moderadas). O ácido mais utilizado é o ácido sulfúrico (H_2SO_4), no entanto também podem ser utilizados outros ácidos como o ácido trifluoroacético (CF_3COOH), o ácido clorídrico (HCl) e ácido nítrico (HNO_3). Ácidos mais fracos também podem ser utilizados, mas geralmente só na hidrólise com ácidos diluídos (Torget *et al.* 1991, Gírio *et al.* 2010).

1.3.2.2.1 Hidrólise com ácidos concentrados

Os processos de hidrólise com ácidos concentrados são bastante caros e provocam alguns problemas operacionais, como a corrosão dos equipamentos (Gírio *et al.* 2010). Os ácidos concentrados permitem a solubilização da celulose e das hemiceluloses, obtendo-se uma fase sólida constituída essencialmente por lenhina. A solubilização dos polissacarídeos é possível utilizando diferentes concentrações de ácido, como: 72% de H_2SO_4 , 41% de HCl ou 100% de CF_3COOH (Fengel and Wegener 1983)

Os ácidos concentrados permitem operar a temperaturas e pressões baixas, levando à formação de pequenas quantidades de produtos de degradação durante a hidrólise. A recuperação dos ácidos é fundamental para a viabilidade económica do processo. No entanto, os custos de neutralização associados têm dificultado a utilização deste processo de hidrólise. Também os problemas associados à corrosão de equipamentos tornam este processo desvantajoso em relação à hidrólise com ácidos diluídos (como se verá na secção seguinte) e aos métodos hidrotérmicos (Ogier *et al.* 1999, Carvalheiro *et al.* 2008, Mohammad *et al.* 2008).

1.3.2.2.2 Hidrólise com ácidos diluídos

A hidrólise com ácidos diluídos é o método normalmente mais utilizado na hidrólise das hemiceluloses. O H_2SO_4 diluído (0,5-1,5% ou por vezes até 4%), a uma gama de temperaturas entre 120-200 °C, é o mais utilizado para aplicações industriais, pois para além de ser mais barato, permite atingir rendimentos elevados de açúcares (perto dos 100%) a partir de hemiceluloses. Também podem ser utilizados o HCl , HNO_3 e o ácido fosfórico (H_3PO_4).

Este processo apresenta vantagens em relação ao processo anteriormente referido, pois apresenta menos problemas de corrosão dos equipamentos (Carvalho *et al.* 2008).

A hidrólise com ácidos diluídos também tem vindo a ser utilizada na despolimerização da celulose, utilização de uma hidrólise dietápica, numa primeira etapa para remoção das hemiceluloses e numa segunda etapa na remoção de celulose sendo assim possível a obtenção de rendimentos elevados de hidrólise (Kim *et al.* 2001, Carvalho *et al.* 2008).

Os produtos resultantes da auto-hidrólise e da hidrólise com ácidos diluídos ou concentrados dos ML são uma mistura de OS, monossacarídeos, ácido acético, compostos furânicos e alguns compostos fenólicos derivados da lenhina. De entre os compostos furânicos, o furfural (Furf) é o produto de degradação das pentoses e o 5-hidroximetilfurfural (HMF) das hexoses. Tanto o Furf como o HMF podem ainda sofrer reações de decomposição, formando ácido fórmico e ácido levulínico, respetivamente (Carvalho *et al.* 2008).

1.3.2.3 O Índice de Seletividade (HSI)

Embora a extensão da recuperação das frações distintas da biomassa seja função da matéria-prima usada, o cálculo da seletividade de um determinado processo é útil para caracterizar tais processos e para facilitar a seleção entre eles. Assim foi introduzido um novo conceito de “Índice de Seletividade para as Hemiceluloses” (HSI) (Gírio *et al.* 2012)

O HSI é traduzido pela seguinte equação:

$$HSI = \frac{R_{Hemicelulose}}{R_{Hemicelulose} + R_{Celulose} + R_{Lenhina}} \quad (\text{Equação 1})$$

onde R_i é a recuperação da fração específica no respetivo fluxo de corrente, geralmente líquido. A recuperação individual de cada fração é calculada pela razão entre a fração recuperada e a composição inicial. O HSI varia de 1 para um processo totalmente seletivo a 0 para um processo que não permite uma recuperação da hemicelulose. Um valor de cerca de 0.3 é típico de um processo não seletivo (Gírio *et al.* 2012).

Da análise da literatura, a hidrólise com ácidos diluídos é o processo mais seletivo, independentemente da matéria-prima usada (Gírio *et al.* 2012), no entanto, leva a uma recuperação das hemiceluloses na forma monomérica, não como no caso dos OS, como vimos anteriormente (secção 1.3.2.1.1.).

1.4 Modelação matemática do fracionamento dos materiais

Como descrito anteriormente, os tratamentos hidrotérmicos, nomeadamente a auto-hidrólise, são os métodos preferenciais para a solubilização das hemiceluloses com o objetivo

de obter OS. A otimização das condições reacionais do processo hidrolítico, recorrendo a modelos cinéticos, é um recurso fundamental para o aumento da escala (*scale-up*), tanto a nível de demonstração como numa posterior fase comercial (Nabarlatz *et al.* 2004).

A interpretação matemática dos resultados obtidos pode ser feita recorrendo a duas abordagens distintas: os modelos baseados em parâmetros de severidade e em modelos cinéticos pseudo-homogéneos.

1.4.1 Fator de severidade

Para o tratamento de materiais lenhocelulósicos por auto-hidrólise e explosão com vapor, foi proposto por Overend e Chornet (1987) o parâmetro denominado fator de severidade (R_0), definido como:

$$R_0 = \exp\left(\frac{T-T_{ref}}{\omega}\right) \cdot t \quad (\text{Equação 2})$$

onde T representa a temperatura (°C), T_{ref} é a temperatura de referência (normalmente 100°C), t o tempo (min) sendo ω um parâmetro empírico característico do processo, que habitualmente tem o valor de 14,75.

A utilização do parâmetro de severidade apresenta diversas vantagens, não só por permitir a fácil comparação dos resultados obtidos em equipamentos e condições diferentes, mas também porque permite facilmente a transposição de condições de operação para escalas superiores (facilita o *scale-up*). No entanto, a sua utilização não deixa de estar sujeita a algumas críticas, pelo que por vezes é mais vantajoso realizar estudos com modelos cinéticos específicos, como veremos na secção seguinte.

1.4.2 Modelos cinéticos pseudo-homogéneos

O estudo cinético rigoroso, capaz de modelar a degradação das hemiceluloses catalisada por H_3O^+ , é um problema complexo. Os fatores que afetam a degradação dos ML estão relacionados com: a difusão não uniforme dos iões hidrónio, devido à heterogeneidade da matriz polimérica; a ocorrência de reações simultâneas com outros componentes da matriz lenhocelulósica, como a lenhina; o acesso limitado às ligações glicosídicas pelos H_3O^+ , devido a impedimentos estereoquímicos; a variação da superfície específica, disponibilidade da área superficial e acessibilidade do substrato durante a reação (Garrote *et al.* 1999a, Garrote *et al.* 1999b).

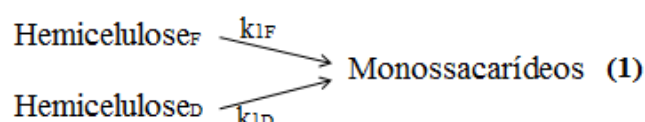
Devido a todos estes problemas associados à modelação cinética da degradação das hemiceluloses, geralmente admitem-se algumas simplificações sendo a principal o assumir-se que a degradação dos polissacarídeos e reações subseqüentes são irreversíveis e que segue

uma cinética de 1ª ordem. As constantes cinéticas de primeira ordem podem ser calculadas a partir de dados experimentais, assumindo-se que a sua dependência com a temperatura segue a equação de Arrhenius (equação 3) (Garrote *et al.* 1999a).

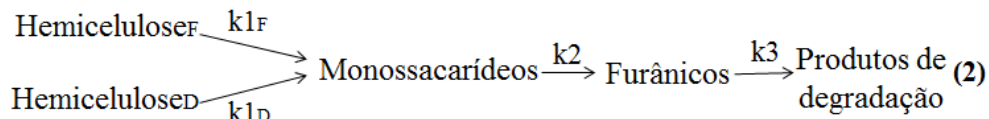
$$k = Ae^{\frac{E_a}{RT}} \quad (\text{Equação 3})$$

Onde, A é o fator pré-exponencial (s⁻¹), E_a a energia de ativação (kJ mol⁻¹), R a constante dos gases perfeitos (kJ K⁻¹mol⁻¹) e T a temperatura (K).

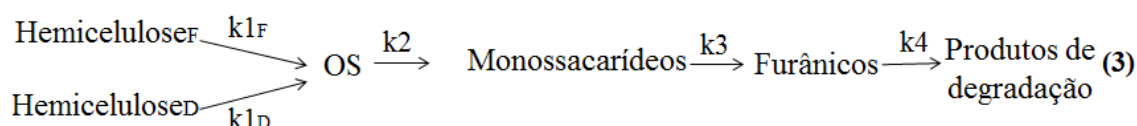
A degradação da fração hemicelulósica, catalisada por ácidos, encontra-se descrita na literatura (Parajó *et al.* 2004) e é proposta uma série de passos reacionais em que se admite que a hemicelulose é composta por duas frações (Hemicelulose_F e Hemicelulose_D) com diferente facilidade de sofrer hidrólise para produzir os respectivos monossacarídeos (1).



Foi também proposta a possibilidade de formação de compostos furânicos e a sua posterior degradação (produtos de degradação) (2) (Vila *et al.* 2002, Vidal *et al.* 2011).



É também descrita (Conner 1984) a formação de OS, na sequência da decomposição das hemiceluloses, e destes em monossacarídeos, compostos furânicos e posterior formação de produtos de degradação (3).

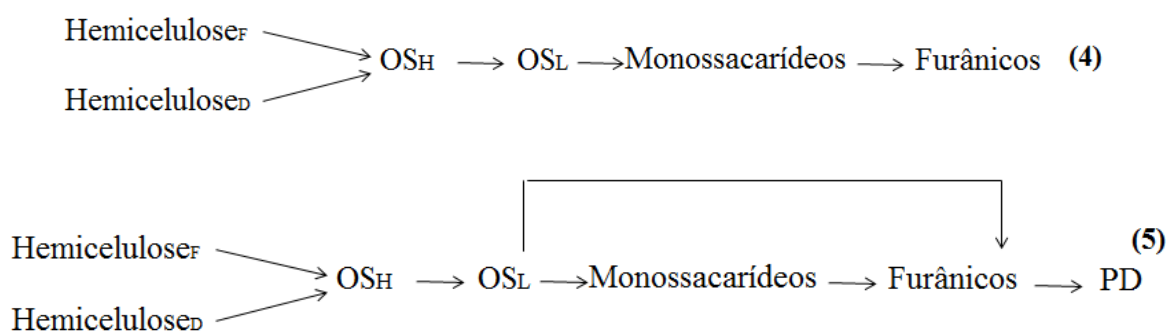


Quanto à auto-hidrólise, é preciso ter em conta a heterogeneidade do DP dos oligossacarídeos obtidos. No início da hidrólise, devido à disponibilidade reduzida de H₃O⁺, formam-se principalmente OS de peso molecular superior, cuja degradação resulta em OS de grau de polimerização progressivamente inferior, os quais são passíveis de serem hidrolisados nos respectivos monossacarídeos. Deste modo, foi introduzido um parâmetro cinético, K₀, dependente do tempo de reação, para a conversão de oligossacarídeos em monossacarídeos

(equação 4), onde os parâmetros K_0_{\max} e β são calculados a partir de dados experimentais (Vila *et al.* 2002).

$$K_0 = K_0_{\max}(1 - e^{-\beta t}) \quad (\text{Equação 4})$$

Ao estimar estes parâmetros, obtém-se um melhor ajuste dos dados do que para os casos em que K_0 não é dependente do tempo, ou seja, $K_0 = K_0_{\max}$ (Vila *et al.* 2002). Uma alternativa passa pelos modelos (4) e (5), nos quais OS_H representa os oligossacarídeos de alto peso molecular e OS_L os oligossacarídeos de baixo peso molecular.



Apesar destes modelos cinéticos, baseados nestes pressupostos, não descreverem com rigor os passos reacionais envolvidos na hidrólise, nem serem válidos para prever as constantes cinéticas dos mesmos, são úteis na interpretação e comparação dos resultados experimentais obtidos sob várias condições (Garrote *et al.* 1999a).

1.5 Novas fontes de oligossacarídeos

Como referido anteriormente, os OS têm um grande potencial para melhorar a qualidade de muitos alimentos e, além disso, possuem propriedades benéficas para a saúde. Assim, o interesse em utilizar os OS em compostos alimentares e farmacêuticos tem aumentado bastante ao longo dos anos. Este facto tem incentivado o desenvolvimento de pesquisas sobre a descoberta de novos OS, tornando-se vantajoso pois é possível acrescentar um valor adicional aos produtos a que os consumidores já costumam estar familiarizados.

A produção de OS no âmbito das biorrefinarias, tendo por base ML com composição e estrutura química diversificada, poderá levar à obtenção de novos OS. Como tal, para este trabalho foram selecionados quatro resíduos agroindustriais, filogeneticamente separados entre si, de maneira a explorar a diversidade intrínseca das hemiceluloses. São eles a casca do pinhão, que é proveniente de uma resinosa, o pinheiro manso (*Pinus pinea*), o caroço de pêssago, o bagaço de azeitona extratado (BAE) e as sementes de anona, que são provenientes

de folhosas, o pessegueiro (*Prunus persica*), a oliveira (*Olea europeae*) e a anoneira (*Annona cherimola*), respetivamente.

1.5.1 Casca de pinhão

A Península Ibérica é responsável por 75% da produção mundial de pinhão, obtido a partir do pinheiro manso. Este último é uma espécie florestal com grande importância na economia regional e nacional, pois a seguir à Espanha, Portugal é o país com maior área cultivada de Pinheiro manso (130400 ha). Contudo, devido à sua localização geográfica e às condições climáticas, o nosso país apresenta maior produtividade do que a Espanha. Em 2006 a produção nacional foi de 60 a 70 milhões de pinhas, representando 6×10^2 toneladas de miolo de pinhão produzido, sendo 90% exportado, principalmente para a Itália e Espanha (Costa *et al.* 2008).

No nosso país, cerca de 50% da produção de pinhas encontra-se no Distrito de Setúbal, com maior incidência no Concelho de Alcácer do Sal, sendo que 62% da floresta de pinheiro manso está inserida no Alentejo litoral. O pinhão é um produto nutricionalmente rico em ácidos gordos de grande importância para a saúde humana e ainda tem elevados teores de proteínas. Durante a produção do miolo do pinhão é também produzido um resíduo agroindustrial em grandes quantidades (quando comparado com o fruto), a casca de pinhão. A casca de pinhão representa cerca de 80% da massa do pinhão, correspondendo a uma produção atual de cerca de $1,2 \times 10^3$ toneladas de casca de pinhão em Portugal.

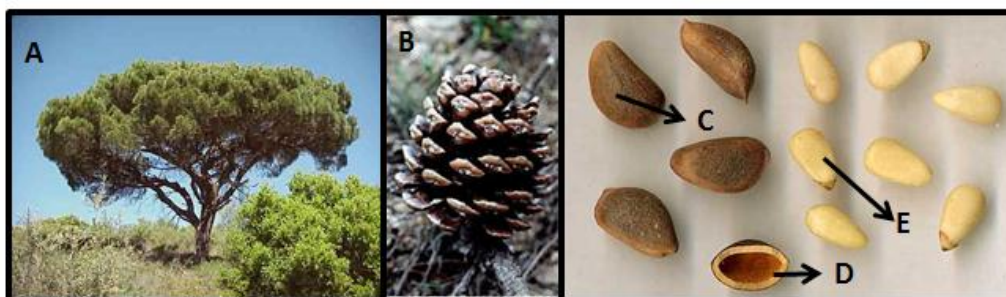


Figura 5 A) Pinheiro manso, B) Pinha, C) Pinhão, D) Casca de pinhão e E) Miolo de pinhão

A casca do pinhão é geralmente desprezada, o que constitui um grande desperdício de recursos naturais. Contudo, mais recentemente, este resíduo chamou a atenção a muitos autores e já é utilizada casca de pinhão para produção de óleos que têm um papel muito importante na redução de doenças de origem alimentar (Liu *et al.* 2011). A caracterização química da casca do pinhão não se encontra descrita na literatura, no entanto, dada a sua natureza lenhocelulósica, é expectável que se poderão obter novos OS, com potenciais aplicações nas indústrias alimentar e farmacêutica.

1.5.2 Caroço de pêssgo

A produção mundial de pêssgo é de cerca de 2×10^7 ton/ano. A China é o maior produtor de mundial, com um volume de produção que representa 50% do total mundial, enquanto a Europa é responsável por apenas 20% (FAOSTAT 2010). A Espanha é o maior produtor de pêssgo na Europa ($1,1 \times 10^6$ toneladas no anos de 2010) (Sánchez-Vicente *et al.* 2009, FAOSTAT 2010). A produção mundial de pêssgos está representada graficamente na Figura 6.

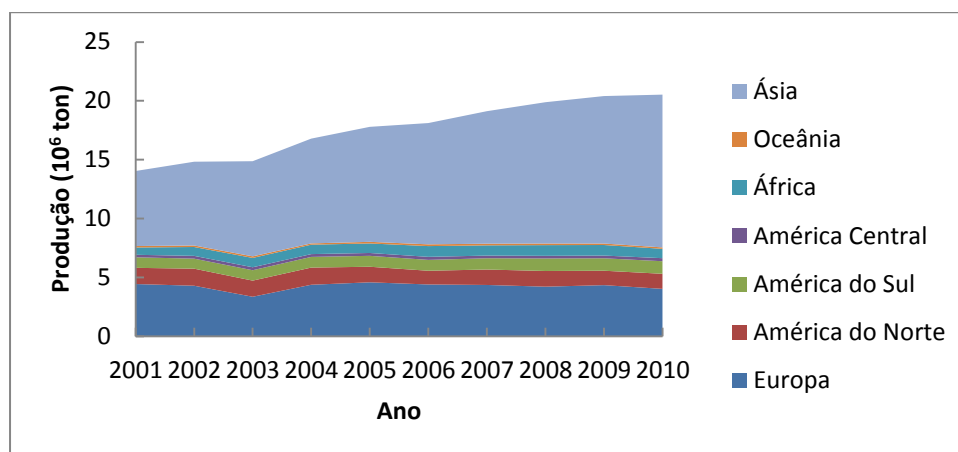


Figura 6 Produção mundial de pêssgo (10^6 ton/ano) (FAOSTAT 2010)

A área coberta por pomares de pêssgo em Portugal é de 3700 hectares, obtendo-se uma produção anual de cerca de $3,3 \times 10^4$ toneladas (FAOSTAT 2010). O pico de produção de pêssgos, em Portugal, ocorre entre Julho e Agosto, podendo no entanto a campanha estender-se até finais de setembro. A maior parte da produção nacional de pêssgos destina-se à comercialização direta, sendo o restante utilizado pelas agroindústrias para a produção de sumos, iogurtes e conservas (OMAIA 2011), de onde resulta como principal subproduto a sua semente (caroço de pêssgo - que representa cerca de 20% da massa do fruto - Figura 7). Dados da Sumol-Compal S.A. (fornecedora do caroço utilizado neste trabalho) referem uma produção anual de caroços de pêssgo de cerca de 3×10^2 toneladas, em Portugal.

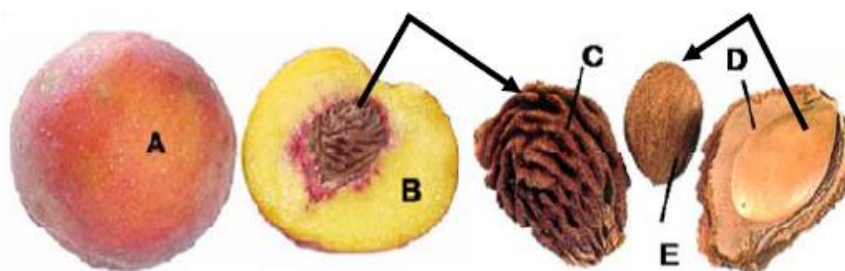


Figura 7 Estrutura do pêssgo: A) Pele ou exocarpo, B) Mesocarpo, C) Endocarpo ou caroço, D) Casca do caroço e E) Amêndoa

Alguns estudos de caracterização química do caroço de pêssgo (casca e amêndoa) revelam um conteúdo de 27,5% (m/m) de proteínas (Rahman *et al.* 1988). A amêndoa contém cerca de 40% do seu peso total em lípidos, sendo por isso considerada como uma fonte importante para a produção de óleos para a indústria alimentar e cosmética (Sánchez-Vicente *et al.* 2009). No entanto, como o objetivo deste trabalho, não é a obtenção de óleos, mas sim a obtenção de OS, e uma vez que a amêndoa tem na sua composição um composto glicosídeo cianogénico (Zaho 2012) (a *D*-amigdalina), optou-se apenas por se utilizar, neste trabalho, a casca do caroço de pêssgo.

Quanto à casca do caroço de pêssgo, que pode ser proveniente do processamento da semente para a obtenção da amêndoa, não se encontram descritas quaisquer utilizações específicas para além da sua utilização como fonte energética. Em Portugal, devido à baixa quantidade disponível, a indústria não considera útil a separação da casca e da amêndoa. Assim, a semente é moída à saída da fábrica, armazenada em *Big-bags* (onde ocorre a secagem) e posteriormente utilizada em combustão direta em caldeiras a biomassa. Assim, o estudo da aplicação da casca do caroço de pêssgo pode ser inovador no que diz respeito à obtenção de novos produtos químicos, nomeadamente de OS.

1.5.3 O Bagaço de azeitona extratado

A extração do azeite é um dos sectores agroindustriais mais importantes nos países mediterrânicos, sendo determinante para a sua economia (Arvanitoyannis *et al.* 2007, Rodríguez *et al.* 2008). A zona mediterrânica é responsável por cerca de 96% da produção mundial de azeite e os países da UE representam 71% dessa produção (E-Toon 2001a) (Figura 8). Em Portugal, a produção de azeite tem vindo a crescer, tendo sido produzidas cerca de 7×10^4 toneladas em 2010/2011.

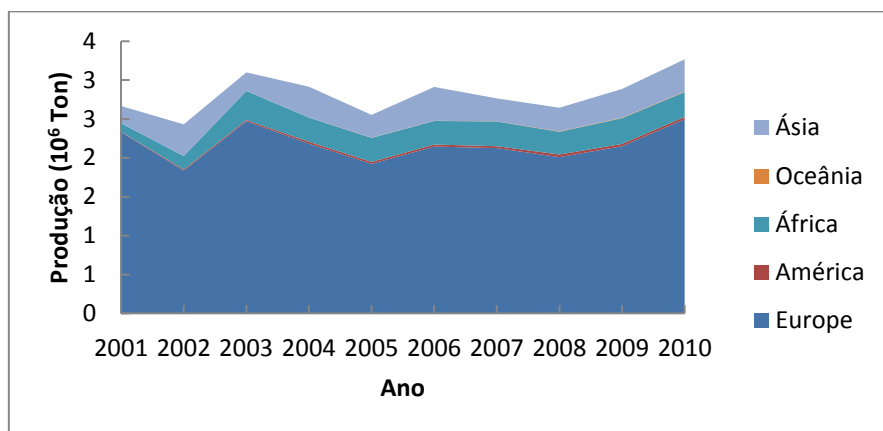


Figura 8 Produção mundial de azeite (10^6 ton/ano) (FAOSTAT 2010)

Durante a produção do azeite, os bagaços retêm um teor residual de azeite, variável consoante o processo de extração. Este pode ser recuperado através de uma pré-secagem (400-800°C) em secadores cilíndricos horizontais rotativos – *rotary drums* – até ser atingida uma humidade de 8%. O bagaço depois é transferido para um equipamento onde o óleo contido no bagaço é recuperado por extração com hexano. Seguidamente, o hexano e óleo de bagaço são separados por um processo de destilação, podendo este último ser reutilizado no processo (E-Toon 2001b). Obtém-se assim um resíduo sólido denominado Bagaço de Azeitona Extratado (BAE – Figura 9) que urge valorizar. Dados da União de Cooperativas Agrícolas do Sul, Uclrl. (UCASUL) referem uma produção de cerca de $5,4 \times 10^4$ ton/ano de BAE em Portugal. (Pedro Lourenço, 2013, Comunicação pessoal).



Figura 9 BAE

1.5.3.1 Tecnologias atuais de valorização do BAE

Em Portugal o BAE é geralmente usado para produção de energia, essencialmente como combustível para autoconsumo em praticamente todas as empresas extratoras de óleo de bagaço de azeitona. É também muito utilizado como combustível para a produção de calor noutras indústrias, como por exemplo, na produção de tijolo, em fábricas de produção de pastas celulósicas e em aviários (E-Toon 2001c).

No âmbito das biorrefinarias, a utilização do BAE tem sido recentemente alvo de investigação, no que diz respeito à sua utilização para produção de biocombustíveis e de produtos de valor acrescentado (Fernández-Bolaños *et al.* 2002, Georgieva *et al.* 2007, Coimbra *et al.* 2010), em vez da sua simples utilização para fins energéticos (queima). Esta abordagem poderá ser bastante atrativa do ponto de vista económico e ambiental, na medida em que os resíduos por esta gerada são suscetíveis de sofrer uma conversão termoquímica (combustão, gaseificação e pirólise) (Masghouni *et al.* 2000, Caputo *et al.* 2003, Arvanitoyannis *et al.* 2007) ou compostagem posteriores (Serramia *et al.* 2010). Dentro deste enquadramento, e tendo em conta a tipologia/estrutura das hemiceluloses presentes no BAE

(secção 3.1.1.4), a produção de OS, a par da produção de biocombustíveis, pode constituir-se como outra alternativa interessante e facilmente integrada.

1.5.4 Sementes de anona

A anona (figura 10) é um fruto rico em vitaminas e proteínas, mas tem na sua composição bastantes hidratos de carbono necessários à nutrição humana, que atuam como uma excelente fonte de energia. Na Ilha da Madeira há uma elevada produção e consumo de *Anona cherimola*, sendo parte dessa produção exportada. Contudo, cerca de metade da produção total é perdida e são produzidas 500 toneladas de resíduos, todos os anos. Estes resíduos geralmente são rejeitados ou usados como fertilizantes - cerca de 2,5% do peso total dos resíduos são sementes de anona. A produção de *Anona cherimola* é também bastante desenvolvida em alguns países da América latina, pelo que grandes quantidades de resíduos estão também disponíveis noutros países (Branco *et al.* 2010).

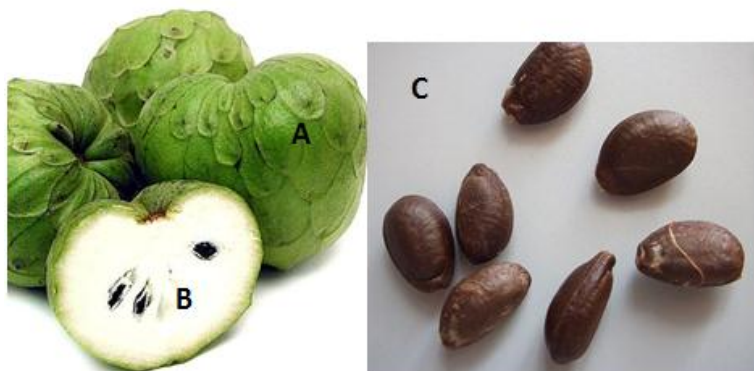


Figura 10 Estrutura da *Annona cherimola* Mill.: A) Pele ou exocarpo, B) Mesocarpo e C) Sementes

As sementes de *A. cherimola* contêm triglicerídeos (cerca de 30%), sendo os ácidos gordos maioritários o ácido oleico (38,58%), o ácido linoleico (35,97%), o ácido palmítico (19,99%), o ácido esteárico (4,16%) e o ácido linolénico (1,31%) (Branco *et al.* 2010).

Quanto ao restante material é de natureza lenhocelulósica e ainda são poucos os estudos realizados para a sua valorização. Resultados anteriores referem a presença de hemiceluloses ricas em pentoses nas sementes de anona (Watanabe *et al.* 1984). Assim, esta informação da sua composição é relevante quando o objetivo é a produção de OS.

1.6 Objetivos do trabalho

Pelo exposto anteriormente, torna-se assim importante estudar e otimizar as condições operacionais que levam à eficiente produção de OS a partir de cada um dos materiais, bem

como caracterizar a estabilidade dos OS produzidos. De maneira a atingir estes objetivos foram consideradas as seguintes etapas:

- ✓ Caracterização física e química dos diferentes materiais utilizados;
- ✓ Estudo do processo de auto-hidrólise para produção de OS;
- ✓ Caracterização química dos licores obtidos durante a auto-hidrólise;
- ✓ Modelação do processo de hidrólise;
- ✓ Avaliação da estabilidade dos licores durante o armazenamento;
- ✓ Avaliação da estabilidade dos OS produzidos, em função do pH e da temperatura.

Paralelamente, e por forma a melhor perspetivar a exploração dos resultados num enquadramento de biorrefinaria, caracterizou-se também o efeito da auto-hidrólise sob a biomassa residual do processo, pelo que se realizou:

- ✓ Caracterização química dos resíduos sólidos obtidos durante a auto-hidrólise;
- ✓ Quantificação da sua digestibilidade enzimática.

A Figura 11 apresenta esquematicamente a organização dos passos envolvidos neste trabalho, para atingir os objetivos anteriormente referidos, bem como os respetivos mercados para aplicação futura dos produtos desenvolvidos.

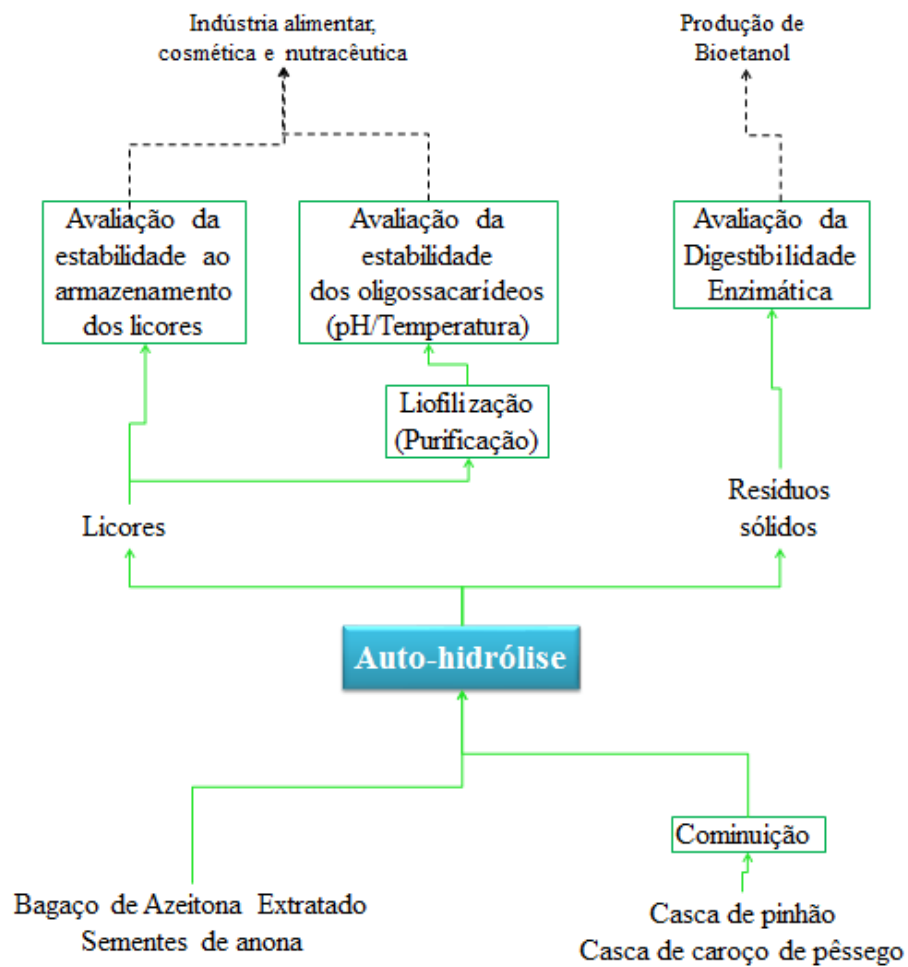


Figura 11 Representação esquemática da organização dos passos envolvidos neste trabalho e respectivos mercados de aplicação para os produtos desenvolvidos

2 Materiais e Métodos

2.1 Materiais

A casca de pinhão, utilizada neste trabalho, foi fornecida pela empresa Preparadora de Pinhões Lda. (Pegões, Montijo) e é proveniente da campanha de 2012. As cascas foram armazenadas à temperatura ambiente em sacas de serapilheira até ao seu processamento.

O caroço de pêssgo utilizado neste trabalho foi cedido pela Sumol-Compal S.A. (Almeirim) e é proveniente da campanha de 2012. Os caroços fornecidos foram secos numa estufa (J.P. Selecta, Espanha) a 80 °C até peso constante e em seguida transferidos para bidons de plástico (PE) com capacidade de 30 L e mantidos à temperatura ambiente.

O bagoço de azeitona extratado (BAE) utilizado neste trabalho foi fornecido pela UCASUL (Alvito, Beja) e é proveniente da campanha de 2012. O BAE foi armazenado em sacas de serapilheira até ao seu processamento.

As sementes de anona foram fornecidas pela empresa de licores J. Faria & Filhos. Lda (Funchal) e é proveniente da campanha 2011. As sementes foram trituradas e armazenadas à temperatura ambiente em recipientes de plástico (PE), até serem processadas.

2.1.1 Preparação dos materiais

2.1.1.1 Casca de Pinhão

Uma vez que as dimensões das cascas de pinhão não são indicadas para o processamento hidrotérmico, foi necessário recorrer a um moinho de facas (Waring, Snijders Scientific, Holanda) para a sua cominuição, tendo-se otimizado as condições de operação (tempo e potência). Este tipo de moinho, sem crivo, produz amostras bastante heterogéneas em termos granulométricos e após caracterização granulométrica (secção 2.7.1.1), apenas a fração compreendida entre 1,00 e 3,55 mm, foi seleccionada para utilização, tendo sido armazenada num recipiente plástico (PE) à temperatura ambiente.

2.1.1.2 Casca do caroço de pêssgo

Como referido anteriormente, o caroço de pêssgo é constituído pela casca e amêndoa; neste trabalho optou-se por trabalhar apenas com a casca. A separação da casca e da amêndoa foi efetuada manualmente recorrendo a um torno. Dado que a dimensão das cascas de caroço, mesmo depois da separação, não é indicada para sua utilização nos

tratamentos hidrotérmicos, utilizou-se, tal como no pinhão, um moinho de facas para a sua cominuição (otimizando as condições de operação - tempo e potência).

Decorrida a caracterização granulométrica, apenas a fração compreendida entre 1,00 e 3,55 mm foi utilizada neste trabalho. A fração selecionada foi armazenada num recipiente plástico (PE) à temperatura ambiente.

2.1.1.3 Bagaço de azeitona extratado

O BAE fornecido já se encontrava na forma triturada fruto do processamento industrial anterior, e de maneira a uniformizar tanto quanto possível os diferentes lotes de matéria-prima, também apenas a fração compreendida entre 1 e 3,55 mm foi utilizada neste trabalho, tendo sido armazenada num recipiente plástico (PE) à temperatura ambiente.

2.1.1.4 Sementes de Anona

O processamento das sementes de anona foi otimizado em trabalhos anteriores (Branco *et al.* 2010). Resumidamente, as sementes foram trituradas num moinho de facas e o óleo extraído usando hexano, numa razão líquido/sólido (RLS) de 10 (V/m). A extração foi realizada em frascos (Schott, Alemanha) fechados e colocados numa incubadora orbital (Comecta Ivy Man, Espanha), a 30 °C, pelo menos durante 48 h, sob agitação (250 rpm). Terminada a extração, a mistura é separada por filtração utilizando papel de filtro (filtração rápida - Whatmann n.º 41). Seguidamente, as sementes são secas numa estufa a 50 °C e trituradas num moinho de facas com um crivo de poro de 1,5 mm. O hexano é recuperado por destilação e reutilizado.

2.2 Obtenção de oligossacarídeos por auto-hidrólise

Os tratamentos hidrotérmicos (auto-hidrólise) foram efetuados num reator de aço T316 SS de 2 L (Parr Instruments Company, EUA, Figura 12) aquecido por uma manta externa. A mistura é agitada por duas turbinas de quatro pás planas. Quando necessário, o reator é arrefecido através de uma serpentina interna onde circula água à temperatura ambiente. As condições operacionais (temperatura, agitação e pressão) são monitorizadas através de um controlador PID, modelo 4842 (Parr Instruments Company, EUA).



Figura 12 Reator Parr® e respetivo controlador utilizado neste trabalho

Para a casca de pinhão, casca do caroço de pêssigo e BAE, utilizou-se uma RLS de 3 (m/m) e uma massa total de 1,2 Kg. Para as sementes de anona, a massa total foi também de 1,2 kg, mas a RLS foi de 5 (m/m). Todos os ensaios foram realizados em condições não isotérmicas, numa gama de temperaturas finais entre 150 e 230 °C, à exceção dos ensaios com BAE que foram realizados em condições isotérmicas a 150 °C, numa gama de tempos entre 0 h e 4 h. A velocidade de agitação foi fixada a 150 rpm para todos os ensaios realizados.

Os perfis de aquecimento e de pressão, foram traçados para todos os ensaios realizados para todos os materiais.

No caso da casca de pinhão e da casca do caroço de pêssigo, como são materiais pouco higroscópicos, após o tratamento, procedeu-se à separação do sólido e do hidrolisado através de uma filtração por papel de filtro (filtros Millipore® com um diâmetro de poro 0,45 µm) sob vácuo. No BAE e nas sementes de anona (materiais mais higroscópicos) as fases líquida e sólida foram recuperadas primeiramente por prensagem até 200 bar utilizando uma prensa de óleo manual (Sotel, Portugal). Todos os sólidos foram lavados com aproximadamente 500 mL de água destilada. Os licores e os resíduos sólidos recuperados foram congelados a -20 °C até posterior utilização.

No final de cada tratamento, de modo a identificar os compostos residuais depositados nas paredes do reator, o mesmo foi cheio com 1,2 kg de acetona durante 24 h, retirando-se em seguida alíquotas que se evaporaram à temperatura ambiente, a restante acetona foi recuperada para ser reutilizada. O sólido residual resultante foi dissolvido em alíquotas de uma solução acetona: água de 1:1 e analisado por eletroforese capilar de zona (CZE). Infelizmente não foi possível identificar nenhum composto.

Os resíduos sólidos foram caracterizados fisicamente quanto à sua densidade aparente (secção 2.7.1.2). Os licores e os resíduos sólidos obtidos foram caracterizados quimicamente (secção 2.7.3 e 2.7.2. respetivamente), tendo-se avaliado estabilidade dos licores obtidos ao armazenamento e a estabilidade dos OS produzidos, ao pH e à temperatura (secção 2.3) e nos resíduos sólidos a digestibilidade enzimática, utilizando enzimas comerciais (secção 2.6).

2.3 Avaliação da estabilidade dos licores ao armazenamento

Para determinar a estabilidade ao armazenamento dos licores, foram utilizados cerca de 500 mL de cada um dos licores obtidos nas condições otimizadas. Os licores foram filtrados (filtros Millipore® com um diâmetro de poro 0,45 µm) para frascos Schott e deixados à temperatura ambiente, em local seco e escuro, retirando-se, a intervalos de tempo regulares, alíquotas para serem analisadas por HPLC (secção 2.7.3.1). Seguidamente foi efetuada uma hidrólise ácida a estas alíquotas (ver secção 2.7.3.2) de modo a dosear os OS presentes.

2.4 Liofilização dos licores

Os licores obtidos nas condições otimizadas foram filtrados (filtros Millipore® com um diâmetro de poro 0,45 µm) e divididos em frascos de boca larga de 500mL. Seguidamente, as amostras foram então liofilizadas num liofilizador (Labconco, EUA). A temperatura de liofilização foi de -35 °C e a pressão foi de 0,42 mbar.

2.5 Avaliação da estabilidade dos OS em função do pH e da temperatura

O procedimento para a determinação da estabilidade dos OS foi desenvolvido neste trabalho, tendo por base alguns dos métodos descritos na literatura (Swennen *et al.* 2006, Courtin *et al.* 2009).

Preparam-se misturas (de concentrações aproximadamente de 100 g/L) dos licores liofilizados em diferentes soluções “tampão”, preparadas previamente segundo o Quadro 3.

Quadro 3 Preparação das soluções “tampão” para a avaliação da estabilidade dos oligossacarídeos e respectivas soluções usadas na sua preparação

| pH | Solução A | Solução B | Vol. Sol. A (mL) | Vol. Sol. B (mL) | Vol. total (mL) | Ref. |
|-----|-----------------------------------------|----------------------------------------|------------------|------------------|-----------------|-------------------------------|
| 1* | 0,2M KCl | 0,2 M HCl | 50,0 | 97,0 | 200,0 | (Clark et al. 1917) |
| 2* | 0,2M KCl | 0,2 M HCl | 50,0 | 10,6 | 200,0 | (Clark <i>et al.</i> 1917) |
| 3 | 0,1M Ácido cítrico | 0,2 M Na ₂ HPO ₄ | 39,8 | 10,2 | 100,0 | (McIlvaina 1921) |
| 7 | 0,1M Ácido cítrico | 0,2 M Na ₂ HPO ₄ | 6,5 | 43,6 | 100,0 | (McIlvaina 1921) |
| 11* | 0,05 M Na ₂ HPO ₄ | 0,1M NaOH | 100,0 | 8,2 | 108,2 | (Robinson <i>et al.</i> 2002) |

* Estas soluções não são soluções tampão verdadeiras, mas para maior facilidade de escrita são assim consideradas neste trabalho, à semelhança do que acontece na literatura.

Para determinar a estabilidade dos OS, as soluções preparadas foram colocadas num banho de óleo termostatzado (Memmert, Alemanha) a duas temperaturas (37 °C e 100 °C), durante 3 h e 1 h, respetivamente, e sendo posteriormente analisadas por HPLC (secção 2.7.3.1).

2.6 Determinação da digestibilidade enzimática da biomassa tratada

O procedimento de hidrólise enzimática, aplicado aos diferentes materiais e aos resíduos sólidos provenientes do processamento hidrotérmico, foi executado com base no protocolo do NREL (Selig *et al.* (2008)). Os ensaios foram realizados em frascos cilíndricos de fundo plano em plástico de 40 mL com tampa, tendo-se normalizado a quantidade de sólido em cada ensaio (0.15 g de biomassa em base seca). À amostra de biomassa congelada foram adicionados 5 mL do tampão citrato de sódio (0,1 M) a pH 4.8, 100 µL de uma solução de azida de sódio, como agente anti-microbiano (2% m/V), e as enzimas *Celluclast* 1.5L e *Novozyme* 188 (Novozymes, Dinamarca), na dose de 60 FPU/g de celulose e 64 pNPGU/g de celulose, respetivamente. Seguidamente, perfez-se o volume com água destilada até 10 mL.

Fizeram-se os respetivos brancos de enzimas (sem biomassa) e brancos de biomassa (sem enzimas), de modo a corrigir os resultados para os sacarídeos livres presentes na biomassa e os produtos que pudessem eventualmente formar-se na ausência das enzimas.

Os frascos foram fechados e colocados numa incubadora Comecta, a 50 °C, durante 72 horas, sob agitação orbital (250 rpm). Terminada a reação, as amostras foram colocadas num banho (Memmert, Concessus S.A.R.L, Portugal) de água em ebulição, durante cerca de 5 min, para inativar as enzimas. Seguidamente, as amostras foram filtradas sob vácuo utilizando filtros Millipore[®] de poro 0.45 µm. O filtrado foi analisado por HPLC (ver secção 2.7.3.1).

2.7 Métodos Analíticos

2.7.1 Caracterização física dos materiais

2.7.1.1 Análise granulométrica

A análise granulométrica foi efetuada com o objetivo de caracterizar fisicamente as matérias-primas e para definir amostras de trabalho mais homogéneas. Para isso, fizeram-se vários ensaios fazendo passar cerca de 100 g de cada matéria-prima por um agitador de peneiros (Endecotts LTP, Lombard Road, Londres, Inglaterra), com sete crivos de 20,3 cm de diâmetro (Retsch, Alemanha, ASTM E11), dispostos em série de acordo com o diâmetro do poro. Para a casca de pinhão e de caroço de pêssigo, foram também relacionadas as condições de cominuição otimizadas (secção 2.1.1.1 e 2.1.1.2), em função das granulometrias obtidas para os dois materiais, ao longo do tempo.

2.7.1.2 Determinação da densidade

A determinação da densidade real dos materiais foi realizada usando o método de deslocamento de água, introduzindo-se uma determinada quantidade de sólido numa proveta (contendo um determinado volume inicial de água) de modo a ler-se o aumento de volume.

A densidade aparente foi determinada adicionando a uma proveta vazia de 100 mL, diferentes massas dos materiais, registando-se o volume ocupado em cada ensaio. Este procedimento foi também efetuado após auto-hidrólise, para todos os materiais e todas as condições testadas, após secagem do material numa estufa a 55 °C até peso constante.

Todos estes procedimentos foram repetidos pelo menos em quintuplicado.

2.7.2 Caracterização química dos materiais e resíduos sólidos

Todas as amostras sólidas utilizadas para a caracterização química foram moídas num moinho de facas (Ika Werck MF10, Staufen, Alemanha), utilizando um crivo de 0,5 mm.

2.7.2.1 Teor de humidade

O teor de humidade presente na matéria-prima e nos resíduos sólidos resultantes da auto-hidrólise foi determinado pesando aproximadamente 2 g de amostra em cadinhos de porcelana, previamente secos em mufla (Heraeus, D-6450, Alemanha) a 550 °C durante, pelo menos, 5 h e tarados numa balança analítica (Mettler HK160, Suíça), colocando-se em seguida a amostra a secar numa estufa a 105 °C até peso constante.

Este procedimento foi repetido sempre que necessário, sendo sempre efetuado pelo menos em duplicado.

2.7.2.2 Teor de cinza

No seguimento da determinação da humidade, os cadinhos de porcelana com as amostras secas foram colocadas num placa de aquecimento e queimadas, sendo depois colocados na mufla a 550 °C, até peso constante. Este procedimento foi efetuado para todos os materiais estudados e para todos resíduos sólidos resultantes da auto-hidrólise e realizado, pelo menos, em duplicado.

2.7.2.3 Teor de extratáveis

Os extratáveis presentes nos materiais foram doseados de acordo com o protocolo experimental do NREL (Sluiter *et al.* 2008) utilizando um extrator de Soxhlet com 85 mL de capacidade. Foram adicionadas 2,0 g de amostra a cada um dos cartuchos de extração.

Começou-se por efetuar a extração com água, adicionando 190 mL de água ultra pura a cada um dos balões já tarados numa estufa a 105 °C. O aquecimento foi ajustado de modo a promover no mínimo, 4 a 5 ciclos por hora, com um tempo de refluxo superior a 16 h.

Seguidamente iniciou-se a extração com etanol. Para tal, adicionaram-se 190 mL de álcool etílico a novos balões tarados. O aquecimento foi ajustado de modo a promover 6 a 10 ciclos por hora, tendo uma vez mais tempo de refluxo de 16 h.

Após ambas as extrações (com água e com etanol), os balões foram colocados no evaporador rotativo, para evaporação do solvente e seguidamente colocados na estufa, até peso constante.

2.7.2.4 Teor de proteínas

A proteína total de cada um dos materiais foi determinada de acordo com o método de Kjeldahl (AOAC 2000). Em tubos de digestão foram colocados 0,5 g de amostra, tendo-se adicionado 10 g de mistura catalisadora (sulfato de cobre, óxido de titânio, ácido esteárico e sulfato de potássio) e 20 mL de H₂SO₄ concentrado (96% m/m). As amostras preparadas foram colocadas na unidade de aquecimento do aparelho de digestão (Digestion System 6 Modelo 107, Tecator, Suécia). Seguidamente colocaram-se as cápsulas do sistema de extração de fumos e abriu-se a fonte de vácuo. Após os primeiros 30 min do processo, a temperatura foi elevada até 420 °C, durante 1,5 h. Terminada a digestão, e após arrefecimento do conteúdo dos tubos, adicionou-se 100 mL de água destilada a 50 mL de ácido bórico 4% (m/V). Em seguida colocaram-se os tubos na unidade de destilação (Kjeltec System modelo 1026, Tecator, Suécia). Durante esta operação de destilação foi libertado amoníaco, por adição da solução de NaOH (50% m/V), arrastado por uma corrente de vapor de água sendo depois recolhido na solução de ácido bórico. O amoníaco foi detetado através de uma titulação ácido-base, utilizando HCl 0,1 M como titulante, situando-se o ponto de viragem do indicador de pH usado (indicador de Tashiro) a um valor de pH de 4,8.

2.5.2.5. Quantificação de polissacarídeos estruturais e lenhina

Quer para os materiais quer para os resíduos sólidos obtidos após auto-hidrólise, pesaram-se cerca de 0,5 g de amostra para tubos de ensaio de 2 cm de diâmetro, aos quais se adicionaram 5 mL de H₂SO₄ 72% (m/m). Em seguida, os tubos de ensaio foram colocados num banho termostatzado (Memmert, Alemanha) a 30 °C, durante 1 h, com agitação ocasional. Seguidamente, o conteúdo dos tubos foi transferido para frascos (Schott, Alemanha) de 250 mL e foi adicionada água destilada, de maneira a diluir o ácido até uma concentração de 4% (V/V).

Posteriormente, os frascos foram colocados na autoclave (Uniclave, Portugal) a uma temperatura de 121 °C, durante 1 h. Após arrefecimento, procedeu-se à filtração da mistura recorrendo a cadinhos de placa porosa (porosidade 3), previamente secos na mufla, como descrito na secção 2.7.2.1.

O resíduo depositado nos cadinhos foi lavado com 100 mL de água destilada, restando assim a lenhina Klason (LK) determinada após secagem e corrigida por subtração do valor das cinzas (como descrito na secção 2.7.2.1 e 2.7.2.2). A fase líquida obtida foi

analisada por HPLC (secção 2.7.3.1). Para cada amostra o ensaio foi realizado sempre em duplicado.

2.7.3 Caracterização química dos licores

2.7.3.1 Doseamento de monossacarídeos, ácidos alifáticos e furanos por HPLC

A quantificação da concentração de glucose (Glc), xilose (Xyl), arabinose (Ara), galactose (Gal), manose (Man), ácidos acético (HAc), fórmico (HCOOH) e levulínico (HLev), HMF e Furf nos licores obtidos durante a auto-hidrólise e nas amostras provenientes da caracterização dos polissacarídeos estruturais ou oligossacarídeos (ver secção seguinte), foi efetuada através da análise por HPLC (Agilent 1100 Series, Alemanha), usando uma coluna Aminex HPX-87H (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA). Pontualmente, foi também usada uma coluna Aminex HPX-87P do mesmo fabricante. As características das colunas e as respetivas condições operacionais estão descritas no Quadro 4. A utilização de duas colunas deve-se à necessidade de resolver diversas co-eluições, que ocorrem nas amostras quando eluídas utilizando a coluna HPX-87H.

Esta necessidade de uma análise em duas colunas é mais premente para as resinosas, não sendo tão necessária para a maioria das folhosas e das plantas herbáceas, onde a xilose é o principal constituinte das hemiceluloses (>90%).

Antes da análise, todas as amostras foram previamente filtradas através de filtros Millipore[®] de diâmetro de poro 0,20 µm. Os monossacarídeos e os ácidos alifáticos, acima mencionados, foram quantificados utilizando o detetor de Índice de refração (IR), enquanto o Furf e o HMF foram quantificados a 280 nm recorrendo ao detetor de fotodiodos (DAD).

As concentrações dos compostos analisados foram calculadas a partir de curvas de calibração, traçadas a partir de soluções padrão, numa gama de concentrações de 0,1-20 gL⁻¹.

Quadro 4 Características das colunas cromatográficas HPX-87H e HPX-87P e respectivas condições operacionais de análise

| Características | Coluna | HPX-87H | HPX-87P |
|------------------------|--------|---------------------------------------|------------------|
| Dimensões da coluna | | 300 x 7.8 mm | |
| Fase móvel | | H ₂ SO ₄ 0.5 mM | H ₂ O |
| Caudal | | 0.6 mL/min | |
| Volume da amostra | | 5 µL | 20 µL |
| Temperatura da coluna | | 50 °C | 80 °C |
| Temperatura detetor IR | | 50 °C | 55 °C |
| Comprimento de onda UV | | 280 nm | |

2.7.3.2 Doseamento de oligossacarídeos

O protocolo de doseamento de OS nos licores de Auto-hidrólise segue o protocolo do NREL (Sluiter *et al.* 2005). As amostras foram preparadas com base no pH do licor. Pesaram-se 100 mL de licor e foi calculada a quantidade necessária de H₂SO₄ 72% (m/m) a adicionar de modo a obter uma concentração do ácido diluído a 4% (m/m).

As amostras preparadas foram autoclavadas a 121 °C durante 1 h. Após arrefecimento, as amostras foram filtradas através de filtros Millipore® de diâmetro de poro 0,20 µm para serem analisadas por HPLC (secção 2.7.3.1). Este procedimento foi sempre efetuado, pelo menos, em duplicado.

As concentrações dos oligossacarídeos foram calculadas a partir do aumento da concentração dos monossacarídeos maioritários presentes (quantificada por HPLC) após a hidrólise ácida dos licores relativamente à concentração inicial destes nos licores de auto-hidrólise e tendo em conta a degradação dos açúcares.

2.7.3.3 Determinação do grau de polimerização dos oligossacarídeos

Para estimar o DP dos oligossacarídeos, recorreu-se à análise de alguns licores por cromatografia de exclusão molecular, usando a coluna BIOSEP-SEC-S400 (Phenomenex, EUA) e utilizando o mesmo equipamento descrito anteriormente (secção 2.7.3.1).

As características da coluna de exclusão molecular e as respectivas condições operacionais são descritas no Quadro 5.

Quadro 5 Características da coluna cromatográfica BIOSEP – SEC – S400 e respectivas condições operacionais de análise

| Características | Coluna BIOSEP - SEC - S400 |
|------------------------|----------------------------|
| Dimensões da coluna | 300 x 7,8 mm |
| Fase móvel | NaNO ₃ 50 mM |
| Caudal | 0,7 mL/min |
| Volume da amostra | 20 µL |
| Temperatura da coluna | 30 °C |
| Temperatura detetor IR | 30 °C |

2.7.3.4 Doseamento de compostos fenólicos

2.7.3.4.1 Método de Folin-Cicalteu

Os compostos fenólicos presentes nos licores foram doseados com uma solução de Folin-Cicalteu utilizando como padrão o ácido gálico.

A 100 µL de amostra, filtrada através de membranas Millipore® com um diâmetro de poro 0,45 µm, foram adicionados 5 mL da solução de Folin-Cicalteu 1/10 (V/V) em tubos de ensaio com tampa. Após agitação em vórtex, adicionaram-se 4 mL da solução de carbonato de cálcio 7,5 % (m/V) a cada tubo. Estes foram incubados num banho termostaticado (Memmert, Alemanha) a 45 °C durante um período de 15 min. Seguidamente foram novamente agitados e lidas as absorvâncias a 765 nm, recorrendo a um espectrofotómetro (JASCO V-530, Japão), utilizando como referência água destilada.

De modo a aumentar a reprodutibilidade do método, amostras e padrões foram processados em simultâneo. Os ensaios para cada amostra/padrão foram feitos pelo menos em duplicado, e os resultados expressos em equivalente de ácido gálico (GAE) mg mL⁻¹ de solução da amostra por comparação com a curva de calibração do ácido gálico.

2.7.3.4.2 Método eletroforético

Os compostos fenólicos presentes nos hidrolisados obtidos durante a auto-hidrólise foram analisados por eletroforese capilar de zona (CZE) de acordo com (Roseiro *et al.* 2003). Foi utilizado um equipamento Agilent CE modelo G1600AX e um capilar de bolha, para maior sensibilidade, com revestimento de sílica fundida (Agilent G1600-60232), de 50 µm de diâmetro interno e 56 cm de comprimento. Foi utilizada uma solução tampão de EDTA (20 mM) a pH 9,3. As condições de operação estão resumidas no Quadro 6.

Todas as amostras foram previamente filtradas através de filtros Millipore com um diâmetro de poro de 0,45 µm. As identificações dos compostos foram feitas a partir dos tempos de migração e espectros UV-vis de padrões comerciais analisados nas mesmas condições. Os padrões analisados incluem oleuropeína, tirosol, hidroxitirosol, catecol, 4-metilcatecol, catequina, epicatequina, naringina, naringenina, hidroquinona, siringaldeído, vanilina e ácidos 3-hidroxibenzóico, cafeico, elágico, ferúlico, siríngico, trans-cinâmico e vanílico.

Quadro 6 Condições de operação utilizadas na eletroforese capilar de zona

| Parâmetro | Condições de operação |
|-------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------|
| Temperatura | 25 °C |
| Offset | 8 mm do fundo do vial |
| Injeção | 50 mbar x 15 s. No ânodo (+) |
| Corrente | 120 µA |
| Tempo de migração | 30 min |
| Voltagem | 25 kV com 0,5 min de rampa subida |
| Comprimentos de onda do detetor DAD | 200, 280, 375 nm |
| Espectro | "All in peak", 190 - 600 nm |
| Pré-acondicionamento | 3 min de lavagem com 0,1 M de NaOH seguido de 3 min tampão de corrida |

2.7.4 Quantificação da atividade das enzimas comerciais

A determinação das atividades enzimáticas das enzimas comerciais (*Celluclast* 1.5L e *Novozyme* 188) utilizadas na avaliação da digestibilidade enzimática dos materiais tratados (secção 2.6), é fundamental para determinar o volume necessário a utilizar de cada enzima, por forma a respeitar a padronização requerida no protocolo. Assim, as atividades enzimáticas presentes, atividade total de celulase (FPase), endoglucanase e β-glucosidase, foram quantificadas de acordo com o protocolo do NREL (Adney *et al.* 2008), o protocolo descrito em (Ghose 1987) e o protocolo descrito em (Berghem *et al.* 1974), respetivamente. Uma unidade internacional de atividade de FPase (FPU), endoglucanase e de β-glucosidase (IU) liberta 1 µmol de glucose ou PNP (p-nitrofenol) por minuto, nas condições do ensaio (Ghose 1987, Adney and Baker 2008).

A determinação das atividades foi realizada em tubos de ensaio, onde são adicionadas as enzimas, sob diferentes diluições, em tampão citrato 0,05 M pH 4,8 (devem

ser realizadas pelo menos duas diluições de cada enzima) adicionando o respectivo substrato (ver quadro 7). Seguidamente, os tubos de ensaio, são fechados e colocados na incubadora Comecta, a 50°C, (para o tempo de incubação, ver quadro 7). Terminada a reação, as amostras são colocadas no banho Memmert de água em ebulição, durante cerca de 5 min, para inativar as enzimas. A concentração de glucose libertada é medida pelo método do DNS (ver anexo A) recorrendo ao espectrofotómetro JASCO. A libertação de PNP é também medida espectrofotometricamente a 400 nm.

Paralelamente, fizeram-se os respectivos brancos de substrato (sem enzimas) e brancos de enzimas (sem substrato), sendo este último apenas necessário quando a glucose está presente nas enzimas estudadas e/ou quando são utilizadas diluições mais baixas (Ghose 1987).

No quadro seguinte (quadro 7) encontram-se os respetivos volumes de enzima a adicionar, a solução substrato utilizada, bem como, o respetivo volume e o tempo de incubação.

Quadro 7 Preparação dos ensaios enzimáticos para determinar as atividades enzimáticas de FPase, celobiase e endoglucanase

| Enzimas | V enzimas mL | Substrato | V substrato (mL) | tempo incubação (min) |
|------------------------------|--------------------|--------------------------------------------------------|------------------------|-----------------------------|
| Fpase | 0,5 ^a | 50 mg Papel de filtro Whatman nº1 em 1 mL de tampão | - | 60 |
| Endoglucanase | 0,2 ^b | Carboximetilcelulose (2%) | 1,8 | 10 |
| β-glucosidase (celobiase) | 1 ^a | PNPG (5mM) | 1 | 10 |

^a As diluições devem ser feitas de forma a obter cerca de 2 mg de glucose

^b As diluições devem ser feitas de forma a obter cerca de 0,5 mg de glucose

No Anexo A, também se encontram descritos os cálculos para a determinação das atividades enzimáticas para as três enzimas.

3 Resultados e discussão

3.1 Caracterização físico-química dos materiais

De modo a compreender melhor os materiais em estudo, é importante proceder à sua caracterização física e química, esta última, principalmente ao nível das suas macromoléculas estruturais (celulose, hemiceluloses e lenhinas).

Quanto à sua caracterização física, os materiais estudados neste trabalho foram caracterizados quanto à sua granulometria e à sua densidade (real e aparente). O conhecimento da granulometria é importante para tomar decisões quanto às frações a utilizar no processo de auto-hidrólise. De facto, a dimensão das partículas dos materiais é importante, pois entre outras implicações, pode influenciar a transferência de massa e de calor (Vidal *et al.* 2011, Torrado *et al.* Forthcoming) e, para além de que, partículas muito pequenas ou muito grandes dificultam o armazenamento e manuseamento dos materiais.

A densidade, por sua vez, fornece indicações relevantes para o estudo de questões ligadas ao manuseamento e à logística (armazenamento, transporte e processamento dos materiais), pelo que também foi determinada experimentalmente a densidade aparente de cada resíduo sólido obtido após os ensaios de auto-hidrólise (secção 3.2.4).

3.1.1 Seleção, obtenção e caracterização dos lotes dos materiais a utilizar no processo de auto-hidrólise

3.1.1.1 Otimização da cominuição dos materiais

Os materiais usados neste trabalho, apresentam-se fisicamente em formas muito distintas. O BAE e a anona apresentam-se já triturados, ao contrário das cascas do pinhão e das cascas do caroço de pêssgo. Para estes dois últimos materiais, torna-se assim necessário estudar a sua cominuição. Na Figura 13, está apresentada a quantidade de biomassa (%), com um diâmetro de partícula acima de 4,00 mm, da casca de pinhão e de caroço de pêssgo, em função do tempo de cominuição (s).

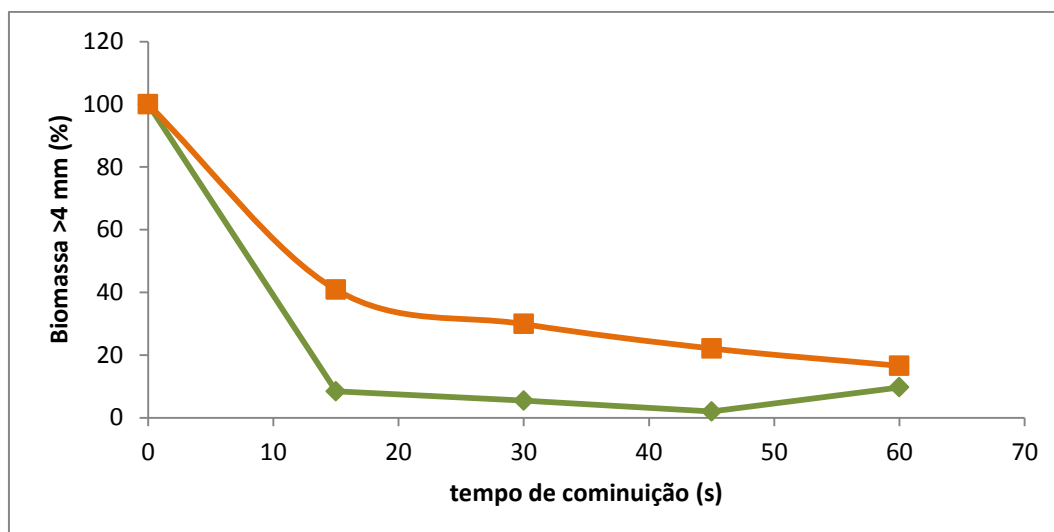


Figura 13 Percentagem de partículas com um diâmetro acima de 4,00 mm, de casca de pinhão (♦) e de casca de caroço de pêssigo (■), em função do tempo de cominuição

Para a casca de pinhão, a partir dos 15 s a quantidade de partículas com diâmetro superior a 4,00 mm, é bastante reduzida e pouco baixa a partir daí, pelo que para este material optou-se por utilizar um tempo de cominuição de 15 s.

Quanto à casca do caroço de pêssigo, a cominuição do material é mais lenta. Este facto deve-se quer ao tamanho inicial do material (maior no caso da casca de caroço de pêssigo), como à dureza intrínseca do material. Deste modo, optou-se pela utilização de um tempo de cominuição de 60 s, a que corresponde a que se obtenha cerca de 55% do material (ver secção 3.1.1.2) utilizável na auto-hidrólise.

Os tempos de cominuição dos materiais, dentro do âmbito das biorrefinarias, constituem uma parcela importante nos custos de produção. É de notar que os gastos energéticos com a cominuição destes dois materiais são muito diferentes, sendo o tempo de cominuição da casca de caroço de pêssigo quatro vezes superior ao da casca de pinhão, traduzindo-se num gasto de energia claramente superior.

Para efeitos da utilização destes materiais na biorrefinaria, o BAE e as sementes de anona, apresentam maiores vantagens que as cascas de pinhão e de caroço de pêssigo, devido à elevada necessidade energética na fase de cominuição (Ballesteros *et al.* 2002) destes dois últimos materiais. A cominuição dos BAE e das sementes de anona é executada previamente, como por exemplo, nos processos de extração de óleo de anona, e deste modo, estes custos não serão imputados diretamente às biorrefinarias. A natureza da matéria-prima é de extrema importância para a eficiência do processo de cominuição, pois

seleciona o tipo de equipamento usado, a energia necessária, assim como o intervalo de tamanhos mais adequados para o posterior fracionamento da biomassa.

3.1.1.2 Caracterização da distribuição granulométrica

A figura 14 mostra a distribuição granulométrica (%) da casca de pinhão (cominuído durante 15 s); casca de caroço de pêssgo (cominuído durante 60 s); do BAE e das sementes de anona.

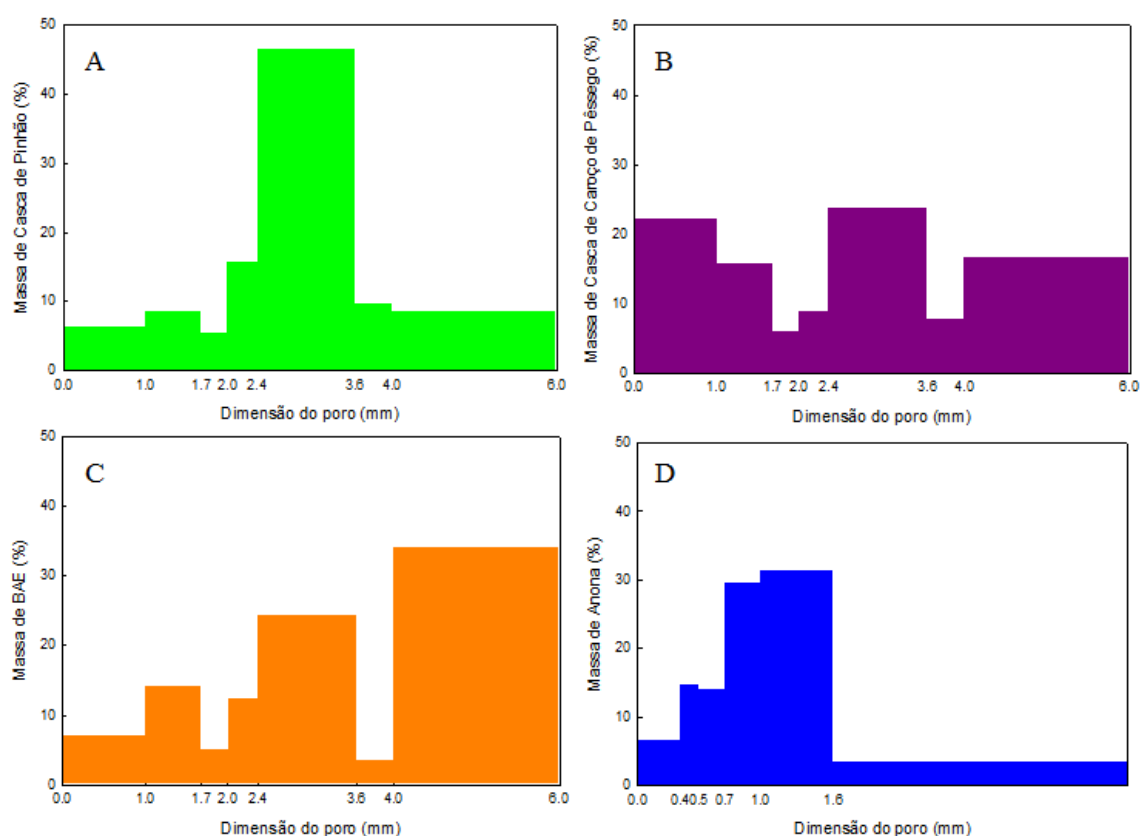


Figura 14 Distribuição granulométrica (%) da casca de pinhão (A, ■), da casca de caroço de pêssgo (B, ■); do BAE (C, ■) e das sementes de anona (D, ■)

Como é possível visualizar, na casca de pinhão, a fração entre 2,36 e 3,55 mm é a mais relevante, no entanto, apenas corresponde a cerca de 45% da casca de pinhão. Assim, neste trabalho, optou-se por utilizar a fração entre 1,00 e 3,55 mm, pois corresponde à fração maioritária, aproximadamente 75%. Além disso, este diâmetro de partícula encontra-se dentro do descrito na literatura como o mais adequado para processos de auto-hidrólise (Vidal *et al.* 2011). A distribuição granulométrica da casca de pinhão é semelhante à descrita na literatura para a palha de milho (Moniz *et al.* 2013).

A cominuição da casca de caroço de pêsego, durante 60 s, traduziu-se numa distribuição granulométrica de partículas mais homogénea, mas com maior formação de finos. A fração entre 1,00 e 3,55 mm corresponde a 55% da casca de caroço de pêsego cominuída nas condições otimizadas.

O diâmetro de partículas do BAE, da campanha de 2012, compreendido entre 1,00 e 3,55 mm, corresponde à fração maioritária de BAE (de cerca de 55%). Deste modo, e para melhor comparar os materiais entre si, foi também a fração utilizada neste trabalho.

Nas sementes de anona, uma vez que estas são moídas previamente a um poro inferior a 1,5 mm, não foi possível utilizar os mesmos crivos. Pela observação da figura 13, é possível concluir que a fração entre 1,00 e 1,50 mm é a mais representativa, no entanto, só corresponde a cerca de 30% do lote de sementes de anona. Deste modo, foi seleccionada a fração entre 0,35 e 1,60 mm para ser utilizada na auto-hidrólise, refletindo-se assim a sua natureza industrial, pois caso contrário perder-se-ia em representatividade.

Após seleccionadas as frações granulométricas, mais adequadas para o processamento por auto-hidrólise, foram determinadas as densidades reais e aparentes das mesmas.

3.1.1.3 Determinação da densidade

No quadro seguinte (Quadro 8) estão apresentados os resultados da determinação da densidade real e da densidade aparente (Kg/m^3), das frações granulométricas utilizadas de cada material no processamento hidrotérmico.

Quadro 8 Densidade aparente e real das frações seleccionadas para cada um dos matérias utilizados neste trabalho

| Material | Densidade aparente (kg/m^3) | Densidade (kg/m^3) |
|---------------------------|----------------------------------------|-------------------------------|
| Casca de pinhão | 690 ± 22 | 1161 ± 40 |
| Casca do caroço de pêsego | 761 ± 18 | 1129 ± 24 |
| BAE | 640 ± 20 | 1163 ± 95 |
| Sementes de anona | 385 ± 14 | 1120 ± 82 |

A densidade aparente apresenta valores muito inferiores em relação à densidade real, tal como esperado. Estes valores inferiores e diferentes entre si, devem-se à ainda diferente distribuição granulométrica dos diferentes materiais (secção 3.1.1.2) e ao consequente espaço vazio existente entre as partículas, considerando-se apenas o volume

do conjunto de partículas que compõe a amostra. Deste modo, a determinação da densidade aparente, é importante para efeitos de transporte e armazenamento dos materiais, pois permite calcular o volume total necessário para esses efeitos.

Pela observação do quadro 7, é possível concluir que a casca de caroço de pêssgo, cujos valores de densidade obtidos rondam os 761 kg/m^3 é o material com maior densidade aparente, sendo o mais fácil de armazenar e transportar. A casca de pinhão e o BAE têm densidades aparentes muito semelhantes, de aproximadamente 650 kg/m^3 . As sementes de anona têm a densidade aparente mais baixa, cerca de metade dos materiais anteriores, o que se traduz no material mais difícil de transportar e armazenar.

Em comparação com valores disponíveis na literatura para a densidade real do bagaço de duas fases (1100 Kg/m^3), o BAE apresentou densidade superior (Georgieva and Ahring 2007). Estes resultados estão de acordo com o esperado, pois traduzem a evaporação de compostos voláteis resultantes da secagem inicial do BAE. Não estão disponíveis na literatura dados relativos à densidade dos restantes materiais, mas os valores obtidos encontram-se dentro dos valores descritos para outros materiais semelhantes, nomeadamente madeiras.

3.1.1.4 Caracterização química

Como referido anteriormente (secção 1.5), a composição química dos materiais é dependente da sua classe taxonómica, mas também a origem geográfica e condições de crescimento agronómico e processamento industrial podem ter uma influência significativa. Assim, torna-se sempre necessário proceder à caracterização química dos materiais em estudo.

A caracterização química de cada um dos materiais utilizados é apresentada no Quadro 9, no qual se encontra a composição média dos materiais, expressa em termos de percentagem de base seca.

Quadro 9 Caracterização química dos materiais (g/100g de material seco)

| Fração | Composição química (g/100g de material seco) | | | |
|----------------|----------------------------------------------|---------------------------|-----------------------|------------------------|
| | Casca de pinhão | Casca de caroço de pêssgo | BAE | Sementes de anona |
| Glucanas | 25,93 ± 0,06 | 22,86 ± 0,91 | 19,22 ± 0,04 | 21,18 ± 0,11 |
| Hemiceluloses | 20,98 ± 0,04 | 29,61 ± 1,18 | 22,13 ± 0,15 | 21,19 ± 0,41 |
| Xilanas* | 16,27 ± 0,05 (~50%) | 24,03 ± 0,96 (0%) | 14,27 ± 0,11 (20%) | 14,17 ± 0,12 (~50%) |
| Arabinanas | 2,72 ± 0,01 | 0,00 ± 0,00 | 2,95 ± 0,01 | 4,87 ± 0,25 |
| Grupos acetilo | 1,99 ± 0,01 | 5,59 ± 0,22 | 4,90 ± 0,03 | 2,15 ± 0,04 |
| Lenhina Klason | 42,63 ± 0,24 | 41,62 ± 0,88 | 38,05 ± 1,49 | 25,72 ± 0,97 |
| Cinza | 3,04 ± 0,14 | 0,20 ± 0,01 | 8,83 ± 0,10 | 2,84 ± 0,00 |
| Proteínas | 4,75 ± 0,06 | 4,48 ± 0,05 | 12,17 ± 0,42 | 22,81 ± 0,03 |
| Extratáveis** | 2,67 ± 0,13 | 2,90 ± 0,10 | 11,78 ± 1,29 | 6,25 ± 1,01 |

* Os valores entre parêntesis correspondem à percentagem de monossacarídeos (galactose e manose no caso da casca de pinhão e galactose, manose e frutose nas sementes de anona) que co-eluem com a xilose

**Calculados por diferença

Pela literatura, sabe-se que a composição química em hemiceluloses das folhosas, varia entre 15 e 21% e das resinosas entre 13 e 26 % (Fengel and Wegener 1983). Assim, pela observação do Quadro 9, e como a casca de pinhão é proveniente de uma resinosa, é possível verificar que os valores obtidos estão de acordo com os esperados (Grohmann *et al.* 1985, Taherzadeh *et al.* 1997, Kim *et al.* 2001). O BAE e as sementes de anona, apesar de serem ambas provenientes de folhosas, também se encontram dentro dos valores esperados, no entanto, para a casca de caroço de pêssgo (proveniente de uma folhosa), tal concordância não é verificada, tendo-se obtido teores de hemiceluloses ligeiramente superiores.

Ao comparar a quantidade de hemiceluloses com a de outros resíduos agroindustriais (Lee 1997, Roberto *et al.* 2003, Sasaki *et al.* 2003), onde esta varia entre 16 e 36 %, é possível observar que todos os materiais se encontram dentro da gama de percentagens esperada, e relativamente próximos da média, ou um pouco abaixo se compararmos com a palha de arroz (Lee 1997, Roberto *et al.* 2003), palha de trigo (Grohmann *et al.* 1985, Schell *et al.* 1991) e o bagaço de cana-de-açúcar (Dekker *et al.* 1983, Sasaki *et al.* 2003), todos estes materiais provenientes de gramíneas.

No que diz respeito ao teor em polissacarídeos totais, os valores são próximos entre si, destacando-se o caroço de pêssgo com um valor superior, principalmente devido à

percentagem de hemicelulose. É importante referir que para o BAE os valores aqui reportados são ligeiramente inferiores aos descritos na literatura (Albuquerque *et al.* 2004). A composição em polissacarídeos, obtida para o BAE ronda os 40% enquanto na literatura são referidos valores para a fração polissacarídica até 50%. A diversidade de valores para o BAE foi já discutida noutros trabalhos e é consequência da sua natureza e processamento industrial.

Em relação ao teor em lenhina Klason, os valores descritos para as resinosas estão entre 26 e 30% (Rydholm 1965, Fengel and Wegener 1983, Olsson *et al.* 1996) e para as folhosas entre 16 e 25 % (Taherzadeh *et al.* 1997, Kim *et al.* 2001, Sassner *et al.* 2005). Deste modo, os valores obtidos experimentalmente para a casca de pinhão e de caroço de pêssago foram superiores ao esperado. Quanto à composição do BAE e das sementes de anona, os valores obtidos, estão em concordância com os da literatura, sendo descritas percentagens compreendidas entre 40 e 50% para o BAE (Albuquerque *et al.* 2004) e de cerca de 26% para as sementes de anona (Branco *et al.* 2010). A elevada percentagem de lenhina no BAE poderá levar à produção de energia, pois a lenhina apresenta um poder calorífico elevado em relação ao petróleo ou ao carvão (Fiechter 1983).

No que diz respeito ao teor de extratáveis obtido para o BAE está de acordo com o descrito na bibliografia, onde é referida a extração de hidroxitirosol e tirosol como uma estratégia válida para a valorização do bagaço de azeitona, mediante uma recuperação e purificação viáveis (Fernández-Bolaños *et al.* 1998, Owen *et al.* 2000, Lesage-Meessen *et al.* 2001, Ramos *et al.* 2013). Outros autores referem os extratáveis de bagaço de azeitona também como uma importante fonte de oleuropeína (Cardoso *et al.* 2006), um glicosídeo de hidroxitirosol.

O baixo teor em matéria inorgânica da casca de caroço de pêssago, apresentado no Quadro 9 pelo teor de cinza, é também importante, pois pode incentivar uma posterior valorização por via termoquímica dos resíduos sólidos resultantes dos processos hidrotérmicos. Pelo contrário, a valorização do BAE por via termoquímica apresentará maiores dificuldades, devido ao elevado teor de cinza presente, o que poderá provocar sinterização durante os processos termoquímicos.

3.2 Caracterização do perfil de auto-hidrólise para os diferentes materiais

O processo de auto-hidrólise foi estudado utilizando condições não-isotérmicas e condições isotérmicas.

Para cada um dos materiais, processados em condições não-isotérmicas, foram efetuados cinco ensaios, na gama de temperaturas entre 150 e 230 °C, recorrendo a uma RLS de 3 (m/m), para a casca de pinhão e a casca de caroço de pêssgo, e uma RLS de 5 (m/m) para as sementes de anona. A utilização desta RLS nas sementes de anona é devido ao facto de ser a razão mais baixa possível, pois caso contrário, não se consegue uma amostra totalmente submersa. No caso do BAE, os ensaios foram realizados em condições isotérmicas a 150°C, numa gama de tempos entre 0 e 4 horas, recorrendo, a uma RLS de 3, numa estratégia de *scale-down*, relativamente às condições aplicadas em estudos anteriores à escala piloto realizado na indústria pelo grupo LNEG. Paralelamente foram realizados ensaios só com água nas mesmas condições, isto é, mantendo-se a massa total do sistema a 1,2Kg (massa total utilizada em todos os ensaios de auto-hidrólise).

Para todos os ensaios realizados foram traçados os perfis de temperatura e de pressão, ao longo do tempo.

A Figura 15 mostra, como exemplo, o perfil de aquecimento para os ensaios em condições não isotérmicas (neste caso para a casca de pinhão) e na Figura 16 estão representados os perfis de temperatura para os ensaios em condições isotérmicas, ou seja para o BAE.

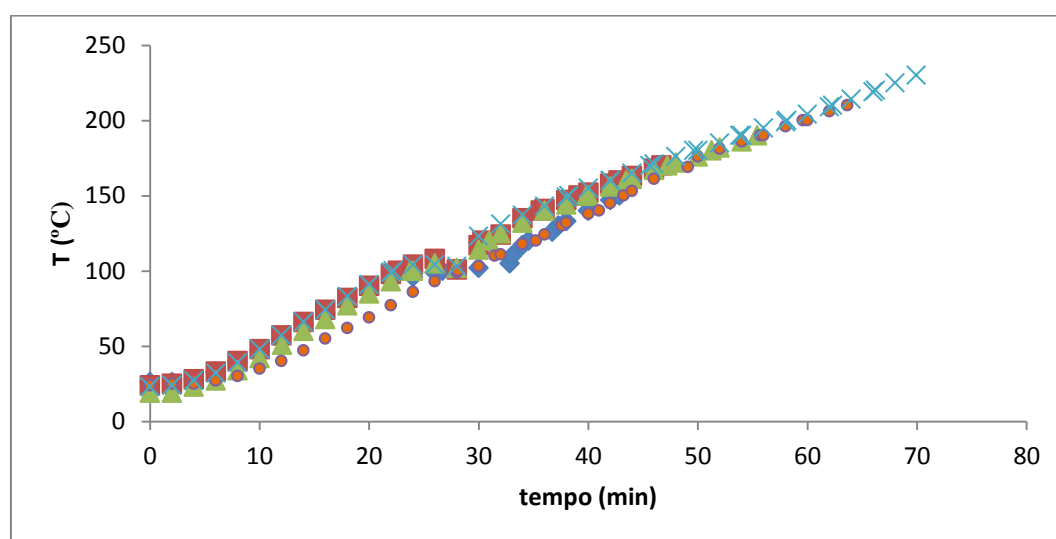


Figura 15 Perfis de aquecimento para os ensaios de auto-hidrólise da casca de pinhão a 150°C (◆), 170°C (■), 190°C (▲), 210°C (●) e 230°C (×)

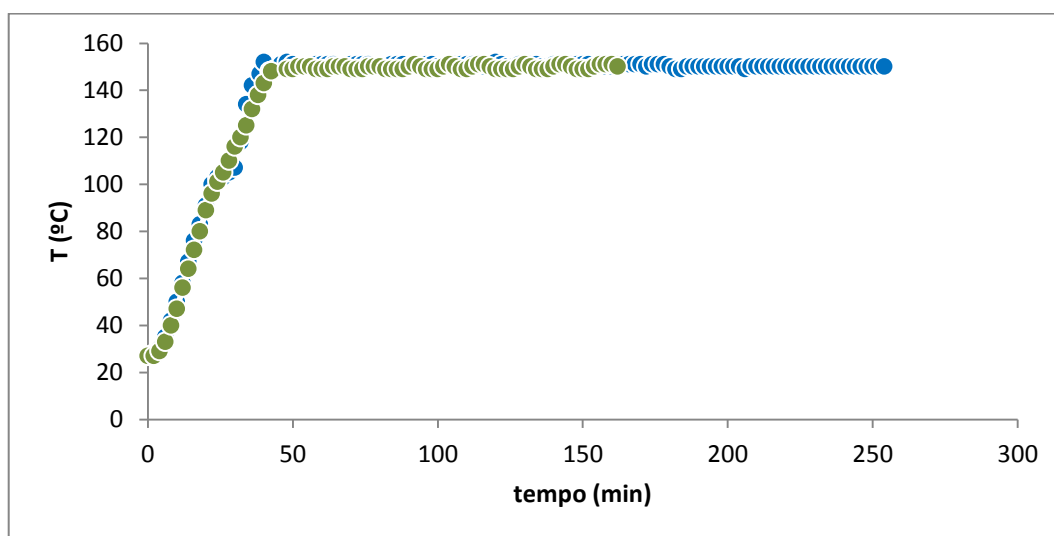


Figura 16 Perfis de temperatura dos ensaios de auto-hidrólise do BAE durante 2h (●) e durante 4h(●)

Como é possível observar, os perfis de aquecimento do reator, seguem uma tendência linear, com o tempo. Nos ensaios isotérmicos observa-se também uma grande estabilidade do valor de temperatura pretendida.

Os perfis são sempre muito semelhantes, variando menos de 10% entre si, independentemente do material exibindo elevada reprodutibilidade. Isto pode também ser observado seguidamente no Quadro 10, onde são apresentadas as condições reacionais empregues para cada ensaio, e o respetivo valor é traduzido num fator de severidade, Log R_0 (ver secção 1.4.1). Este foi calculado por integração numérica, e os dados experimentais do perfil de temperatura, incluindo o aquecimento, o período isotérmico e o arrefecimento, para cada ensaio

Quadro 10 Valores do fator de severidade, Log R_0 , para os ensaios de auto-hidrólise realizados neste trabalho

| T (°C) | Material | | | | |
|--------|-----------------|----------------------------|------|------------|-------------------|
| | Casca de pinhão | Casca do caroço de pêssego | BAE* | BAE** | Sementes de anona |
| 150 | 2,13 | 2,15 | 2,17 | 2,14 (0 h) | 2,37 |
| 170 | 2,80 | 2,81 | 2,75 | | 2,83 |
| 190 | 3,42 | 3,43 | 3,37 | 3,57 (2 h) | 3,60 |
| 210 | 4,01 | 4,07 | 3,97 | 3,83 (4 h) | 4,23 |
| 230 | 4,63 | 4,59 | 4,51 | | 4,70 |

*(Bernardo 2011)

**Todos ensaios realizados a 150°C sob condições isotérmicas. Os tempos de estão apresentadas entre parêntesis

Como se pode observar todos os valores obtidos para as condições semelhantes são próximas entre si.

A partir desta secção, todos os resultados deste trabalho, são apresentados e discutidos em função do fator de severidade, $\text{Log } R_0$.

Seguidamente, apresenta-se a caracterização de cada um dos licores obtidos para cada um dos materiais utilizados, tendo especial atenção ao perfil de produção dos OS. Na secção 3.2.4, é feita uma caracterização físico-química dos resíduos sólidos correspondentes.

3.2.1 Caracterização química dos licores obtidos

Os produtos obtidos e respetivas concentrações variaram consoante as condições empregues. De entre os produtos obtidos nos licores, resultantes da auto-hidrólise de todos os materiais (casca de pinhão – secção 3.2.1.1, casca de caroço de pêssgo – secção 3.2.1.2, BAE – secção 3.2.1.3 e sementes de anona – secção 3.2.1.4), foram identificados e quantificados os OS (gluco-oligossacarídeos - GOS, arabino-oligossacarídeos - AOS e XOS – xilo-oligossacarídeos), monossacarídeos maioritários correspondentes (glucose, xilose e arabinose), ácidos alifáticos (ácidos acético, fórmico e levulínico), compostos furânicos (5-hidroximetil-furfural e furfural) e compostos fenólicos. No final desta discussão é feita uma comparação entre os diferentes materiais no que diz respeito à sua composição em GOS, XOS e AOS (secção 3.2.2). As concentrações de GOS, XOS e AOS foram calculadas a partir das diferenças entre as concentrações dos monossacarídeos correspondentes maioritários presentes nas hemiceluloses do material, entre os licores após hidrólise ácida dos mesmos e os licores resultantes de auto-hidrólise.

Na Figura 17 encontra-se representada a correlação linear entre cada material solubilizado (%) em função das hemiceluloses (%) presentes no material, para a condição onde se obteve a mais alta concentração de OS.

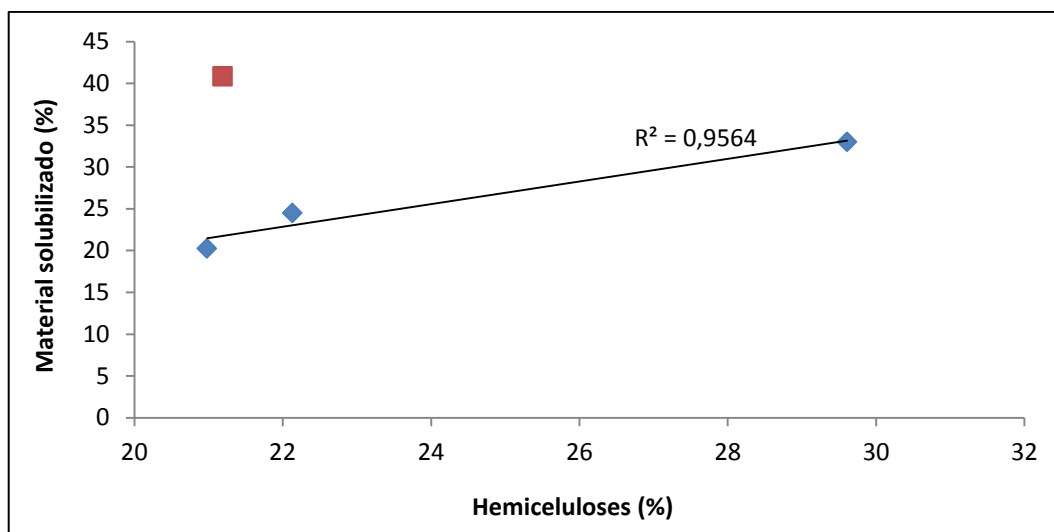


Figura 17 Relação entre o material solubilizado (%) em função das hemiceluloses presentes (o ponto quadrado vermelho (■) é referente às sementes de anona)

Como é possível observar, a solubilização de todos os materiais, à exceção da anona, segue uma tendência linear em função da percentagem de hemiceluloses, o que significa que estamos a solubilizar fundamentalmente as hemiceluloses. No caso das sementes de anona (representada pelo ponto vermelho na figura) tal não se verifica, apresentando um comportamento *outlier* do apresentado para os outros três materiais. Isto deve-se ao facto de que durante a auto-hidrólise das sementes de anona, não se solubilizou apenas hemiceluloses, mas também outras frações, nomeadamente o teor de extratáveis e principalmente o teor de proteínas, que estão numa concentração muito elevada neste material. Este facto é suportado pela Figura 18, que representa a quantidade de cada material solubilizado (%), em função do fator de severidade e ainda se pode observar que a solubilização das sementes de anona é realizada em duas etapas.

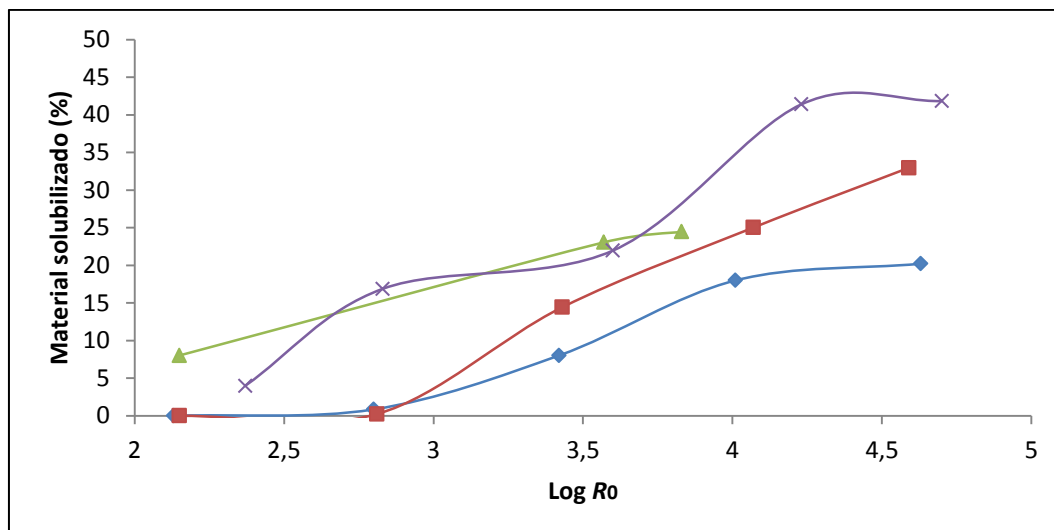


Figura 18 Perfil de material solubilizado (%), em função do Log R_0 , dos ensaios de auto-hidrólise da (♦) casca de pinhão, (■) casca de caroço de pêssgo, (▲) BAE e (×) sementes de anona

Atendendo aos resultados é possível concluir que o aumento da severidade do processo, conduz a um aumento da solubilização das hemiceluloses dos materiais, no entanto, como é possível observar, todos os materiais se comportam de maneiras distintas, pelo que é importante estudar a composição química dos licores resultantes da auto-hidrólise, a qual vai ser discutida seguidamente e em mais detalhe para cada material.

3.2.1.1 Casca de pinhão

Na Figura 19 está representada a composição dos licores obtidos em OS em função dos diferentes fatores de severidade aplicados nos ensaios de auto-hidrólise da casca de pinhão.

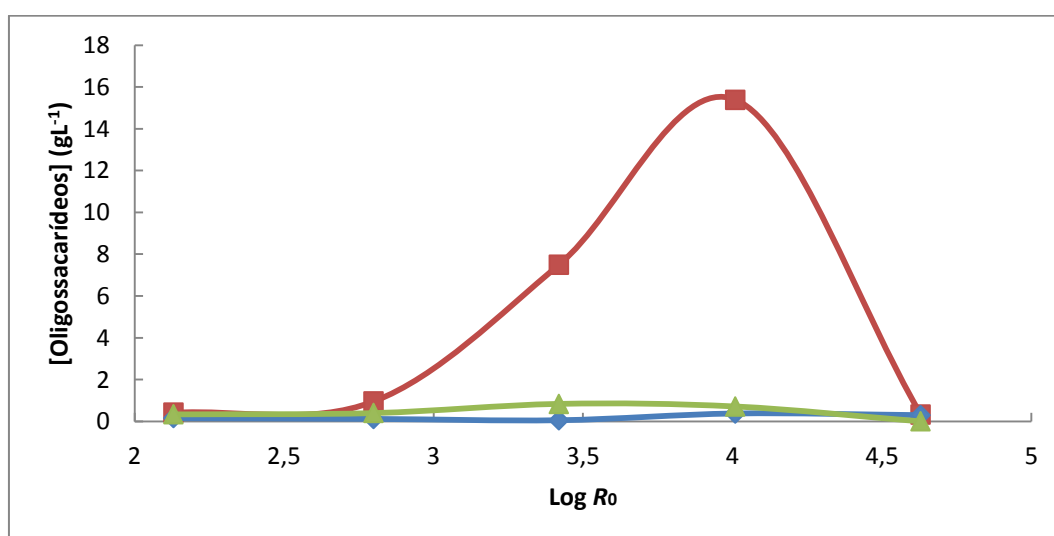


Figura 19 Perfil da concentração de oligossacarídeos (gL⁻¹) em função do Log R_0 nos ensaios de auto-hidrólise da casca de pinhão (■ XOS ♦ GOS ▲ AOS)

A concentração máxima de OS foi atingida para o $\text{Log } R_0 = 4,01$, ou seja a $210\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Quadro 10), tendo-se atingido o valor de $14,88\text{ gL}^{-1}$. Quimicamente, estes OS contêm xilose, galactose e manose refletindo a composição inicial das hemiceluloses, sendo que não foi possível determinar com rigor a proporção relativa entre eles, estimando-se que a xilose seja cerca de 50% dos açúcares oligoméricos presentes (dados preliminares obtidos da coluna de Aminex HP-87P – secção 2.7.3.1).

Para condições mais severas dá-se a diminuição das concentrações de OS devido à sua degradação em monossacarídeos e respetivos produtos de degradação. O decréscimo das concentrações em OS nos licores é observado para severidades superiores a 4,01, pelo que, é de esperar que a concentração em monossacarídeos comece a aumentar, a partir das condições de severidade para as quais a concentração em OS começa a decrescer, ou seja, para $\text{Log } R_0 \geq 4,01$. De facto, o perfil de concentração em monossacarídeos nos licores em função da severidade do processo apresentado na Figura 20 demonstra isso mesmo.

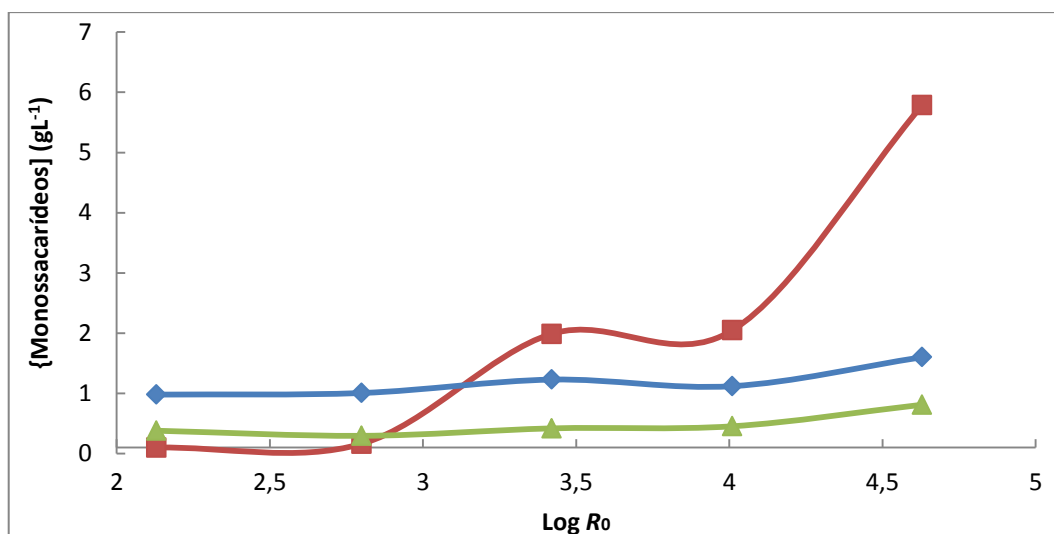


Figura 20 Perfil da concentração de monossacarídeos (■ Xilose, galactose e manose; ◆ Glucose; ▲ Arabinose) (gL^{-1}) em função de $\text{Log } R_0$ nos ensaios de auto-hidrólise da casca de pinhão

Como é possível observar, é evidente o aumento da concentração de xilose, galactose e manose, correspondente à diminuição drástica da concentração de XOS, observada na Figura 19. Para a xilose, os máximos de concentração de açúcares foram obtidos na maior condição de severidade testada, $\text{Log } R_0 = 4,67$, atingindo o valor de $5,69\text{ gL}^{-1}$, o que corresponde a cerca de 43% de xilose, 20% de galactose e 37% de manose. O

valor de xilose (%) é inferior ao esperado, devido à composição química inicial, mas isto deve-se à maior degradação das pentoses em relação às hexoses, como se verá mais à frente.

Para a glucose, os máximos de concentração foram obtidos também na maior condição de severidade testada, $\text{Log } R_0 = 4,67$, atingindo valores de $1,50 \text{ gL}^{-1}$. Quanto à arabinose os valores obtidos são desprezáveis.

Nas figuras 21 e 22 estão representados os perfis de concentração de ácidos alifáticos e de compostos furânicos, respetivamente, em função das condições de severidade de auto-hidrólise testadas, para a casca de pinhão.

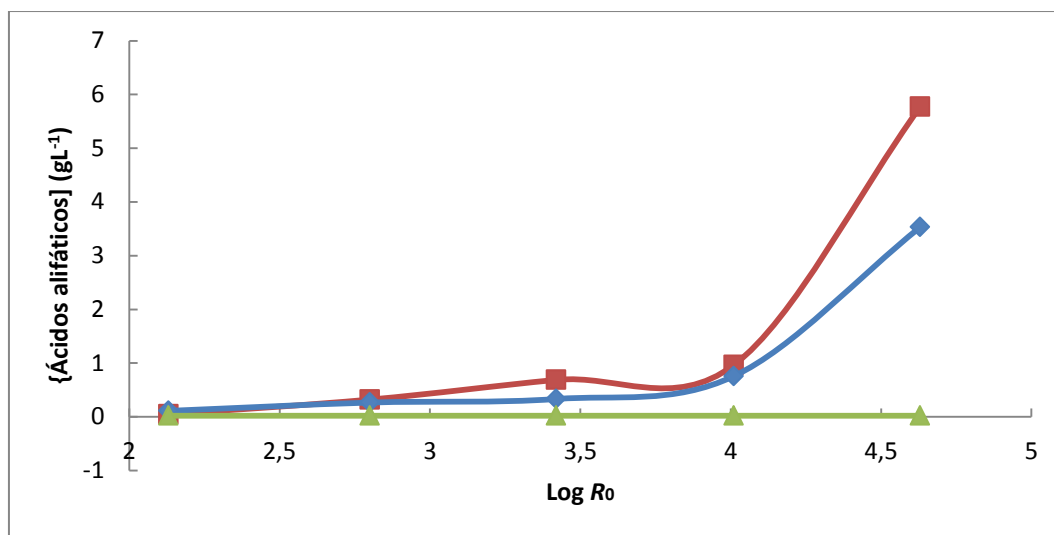


Figura 21 Perfil da concentração de ácidos alifáticos (■ ácido fórmico; ◆ ácido acético; ▲ ácido levulínico) (gL^{-1}) em função de $\text{Log } R_0$ nos ensaios de auto-hidrólise da casca de pinhão

Sabe-se que o ácido acético resulta da hidrólise dos grupos acetilo das hemiceluloses. Neste trabalho, as concentrações obtidas atingiram o valor de $3,53 \text{ gL}^{-1}$. Também era esperado o aumento da concentração de ácido acético, ao longo da severidade do processo, como consequência da hidrólise dos grupos acetilo das hemiceluloses presentes na casca de pinhão.

No caso do ácido fórmico, não foram registadas concentrações de compostos furânicos (Figura 22) que suportem as concentrações elevadas obtidas. Estas concentrações elevadas podem ser justificadas pela co-eluição de compostos não identificados com o ácido fórmico. As concentrações do ácido levulínico são desprezáveis, sendo este um produto de degradação do HMF.

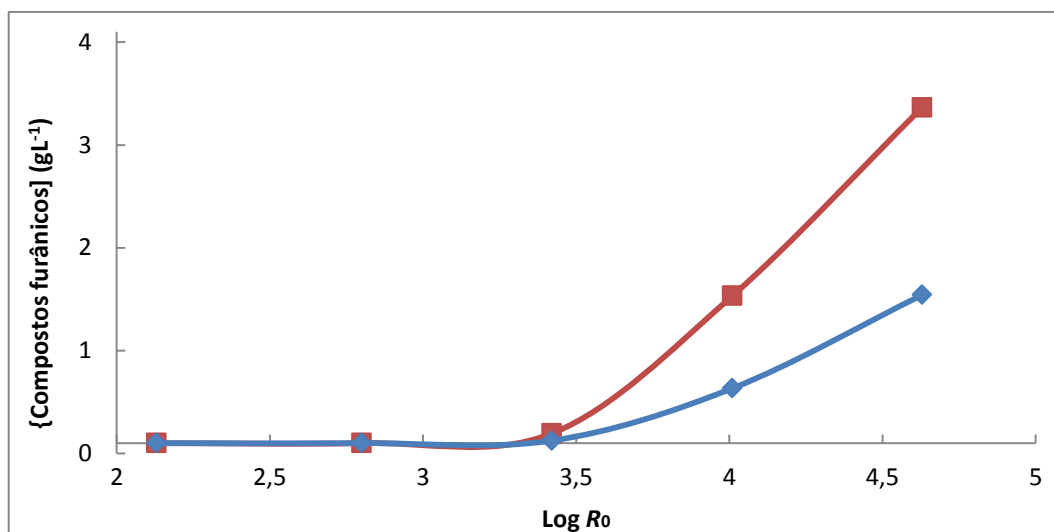


Figura 22 Perfil da concentração de compostos furânicos (■ Furfural; ♦ HMF) (g L^{-1}) em função de $\text{Log } R_0$ nos ensaios de auto-hidrólise da casca de pinhão

As concentrações de compostos furânicos (HMF e furfural) registadas ao longo da severidade evidenciam a degradação dos monossacarídeos. O aumento das concentrações de compostos furânicos obtidas, em particular do furfural, a partir das condições mais severas ($\text{Log } R_0 \geq 4,01$), reflete isso mesmo. Tendo em conta que a partir da condição de severidade ótima ($\text{Log } R_0 = 4,01$) (Figura 19), há um decréscimo acentuado de OS é de esperar que haja um aumento dos monossacarídeos dissolvidos nos hidrolisados, que por sua vez determinam a produção de produtos de degradação.

Também como esperado, ambos os compostos furânicos atingiram máximos de concentração para a maior condição de severidade testada, $\text{Log } R_0 = 4,67$. Para estas condições foram obtidas concentrações de $1,44 \text{ g L}^{-1}$, para o HMF, e de $3,27 \text{ g L}^{-1}$, para o furfural, valores muito próximos dos valores comuns obtidos a partir de resinosas, como o abeto (Almeida *et al.* 2007).

Na figura 23, encontra-se apresentado o perfil da variação de pH ao longo das condições de severidade testadas.

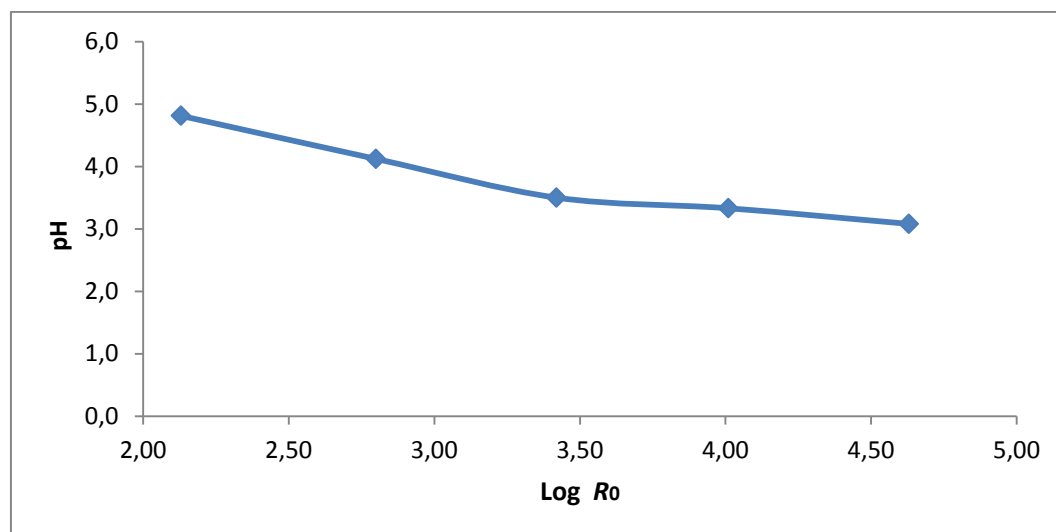


Figura 23 Perfil de o pH ao longo das condições de severidade aplicadas nos ensaios de auto-hidrólise da casca de pinhão

Como é possível verificar os valores de pH diminuem com a severidade do ensaio e pode estar relacionado com o aumento da quantidade de ácido acético (Figura 21).

Os licores de auto-hidrólise da casca de pinhão foram caracterizados, pelo método de Folin-Cicalteu, quanto ao teor de fenóis totais, em função da severidade do ensaio e os resultados estão apresentados na Figura 24.

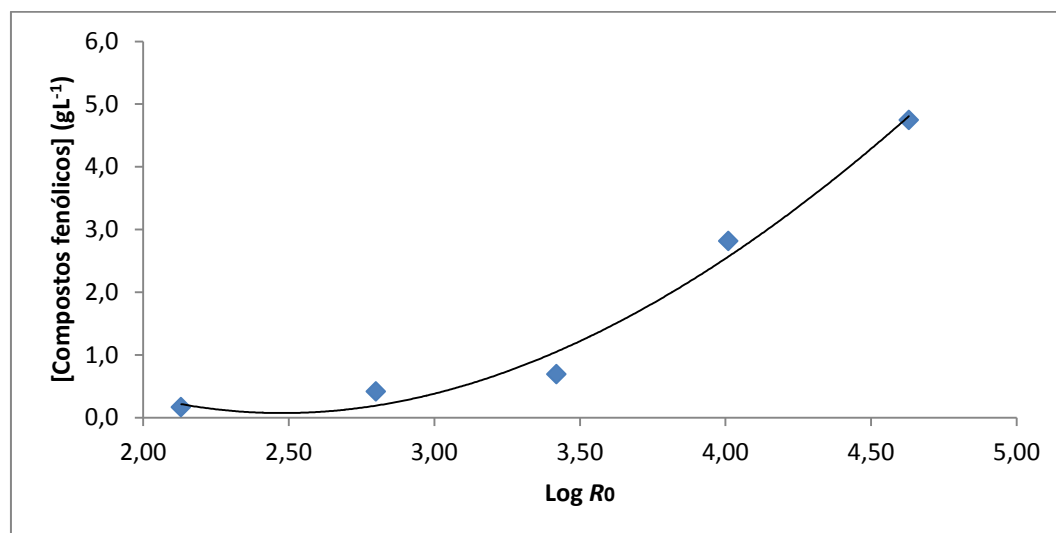


Figura 24 Perfil da concentração de compostos fenólicos (gL^{-1}) em função de Log R_0 nos ensaios de auto-hidrólise da casca de pinhão

O perfil apresentado mostra o aumento exponencial do teor de fenóis, à medida que a condição de auto-hidrólise é mais severa, tendo-se obtido a concentração máxima de 4,7

gL^{-1} para a condição de maior severidade testada, $\text{Log } R_0 = 4,67$. Não é possível comparar o valor encontrado com a literatura, pois tal não se encontra descrito.

Os licores resultantes dos ensaios de auto-hidrólise da casca de pinhão foram analisados por CZE, de maneira a avaliar que compostos fenólicos específicos estão presentes. No quadro seguinte (Quadro 11) está apresentado esquematicamente o teor relativo/comparativo dos fenóis identificados nos licores de casca de pinhão, ao longo do fator de severidade.

Quadro 11 Teor relativo/comparativo dos fenóis identificados por CZE nos licores de auto-hidrólise da casca de pinhão ao longo das condições de severidade testadas

| Composto fenólico | Log R_0 | | | | |
|--------------------------------|-----------|------|------|------|-------|
| | 2,13 | 2,80 | 3,42 | 4,01 | 4,63 |
| Catecol | + | ++ | +++ | ++++ | +++++ |
| Ácido 3-hidroxibenzóico | | | | + | ++ |
| Vanilina | | | + | ++ | +++ |
| Ácido vanílico | + | ++ | +++ | ++++ | +++++ |

Pela análise do quadro 11 e confirmando a conclusão retirada da Figura 24 verifica-se que à medida que as condições aplicadas no processamento hidrotérmico são mais severas, maior quantidade e maior variedade de compostos fenólicos estão presentes nos licores. Os compostos fenólicos obtidos nos licores da casca de pinhão foram o catecol, a vanilina, o ácido vanílico e o ácido 3-hidroxibenzóico. Contudo, a vanilina e o ácido 3-hidroxibenzóico, só são detetáveis a fatores de severidade superiores ($\text{Log } R_0 \geq 3,42$).

3.2.1.2 Casca de caroço de pêssego

Na Figura 25 está representada a composição dos licores obtidos em OS em função dos diferentes fatores de severidade aplicados nos ensaios de auto-hidrólise da casca de caroço de pêssego.

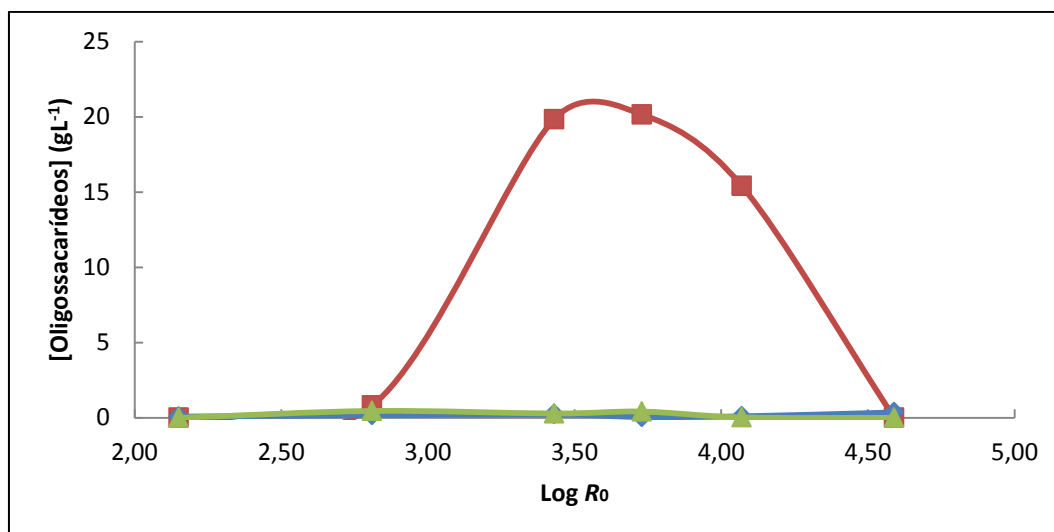


Figura 25 Perfil da concentração de oligossacarídeos (g L^{-1}) em função do $\text{Log } R_0$ nos ensaios de auto-hidrólise da casca do caroço de pêssigo (■ XOS ◆ GOS ▲ AOS)

Com base na figura, foi estabelecida uma condição ótima de temperatura, num fator de severidade compreendido entre 3,43 e 4,07, ou seja, entre 190 e 210 °C. Assim, surge a necessidade de caracterizar em mais detalhe a zona do ótimo, foi então realizado um ensaio adicional a 200 °C, que corresponde ao ponto $\text{Log } R_0 = 3,73$. Deste modo, neste trabalho esta condição foi considerada como a condição ótima para a produção de OS a partir da casca de caroço de pêssigo e, como é possível observar, de essencialmente XOS.

Os XOS quantificados atingiram máximos de concentração de $20,15 \text{ g L}^{-1}$. À mesma condição de severidade, os GOS e os AOS atingiram concentrações de 0,05 e $0,42 \text{ g L}^{-1}$, respectivamente. Estes valores são muito próximos de zero, o que faz com que seja irrelevante a produção de GOS e de AOS, a partir das hemiceluloses presentes casca do caroço de pêssigo.

Para condições mais severas dá-se a diminuição das concentrações de XOS, devido à hidrólise dos mesmos, nos seus componentes monossacarídeos (xilose) e respectivos produtos de degradação (furfural). O perfil de concentração em monossacarídeos nos licores em função da severidade do processo, está apresentado na Figura 26.

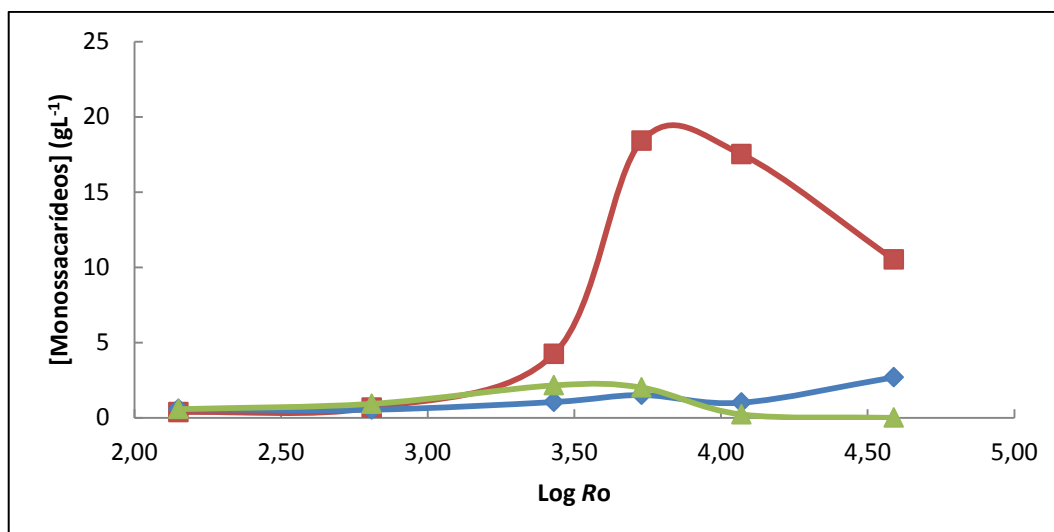


Figura 26 Perfil da concentração de monossacarídeos (■ Xilose; ♦ Glucose; ▲ Arabinose) (g L^{-1}) em função de Log R_0 nos ensaios de auto-hidrólise da casca de caroço de pêssgo

O decréscimo das concentrações em XOS nos licores é observado para severidades superiores a 3,73. Assim, era de esperar um aumento da concentração de xilose para a maior condição de severidade testada, Log R_0 = 4,59, correspondente à diminuição drástica da concentração de XOS. No entanto, este facto não se verifica para a xilose quantificada, podendo ser observado o seu decaimento a partir da condição ótima. Estes dados podem ser justificados pela conversão significativa da xilose no seu produto de degradação – o furfural – como é possível observar pelo aumento da concentração deste ao longo da severidade do processo (figura 28).

A glucose atingiu o valor máximo de 2,70 g L^{-1} , nas condições de maior severidade (Log R_0 = 4,59) correspondente a um rendimento máximo de 2,86 g/100g Gn. A xilose, atingiu máximos de concentração a um Log R_0 = 3,73, tendo-se atingido o valor máximo de 18,40 g L^{-1} , correspondente a um rendimento de 18,48 g/100g Xn.

Nas figuras 27 e 28 estão representados os perfis de concentração de ácidos alifáticos e de compostos furânicos, respetivamente, em função das condições de severidade de auto-hidrólise testadas, para a casca de caroço de pêssgo.

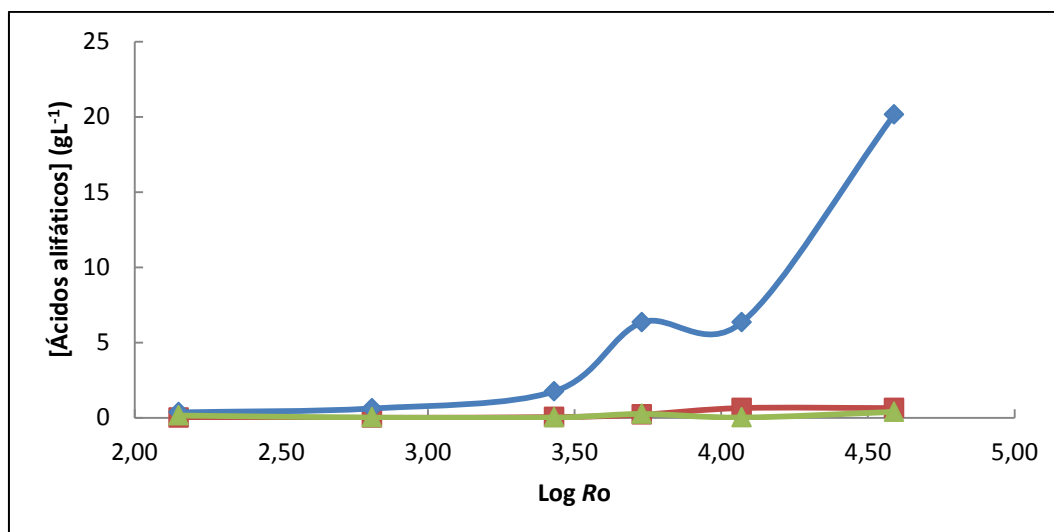


Figura 27 Perfil da concentração de ácidos alifáticos (■ ácido fórmico; ◆ ácido acético; ▲ ácido levulínico) (g L^{-1}) em função de $\text{Log } R_0$ nos ensaios de auto-hidrólise da casca de caroço de pêssgo

Era de esperar que a concentração de ácido acético aumentasse, pelo menos, até ser obtido, um rendimento igual (ou próximo) de 5,59 g/100g de matéria seca (valor obtido na determinação da composição química da casca do caroço de pêssgo – secção 3.1.1.4). Neste trabalho, as concentrações obtidas atingiram rendimentos, em ácido acético, ligeiramente superiores aos correspondentes à solubilização dos grupos acetilo totais. Também era esperado um aumento da concentração de ácido acético com o aumento da severidade do processo. Este facto é observado na figura, permitindo concluir que houve hidrólise dos grupos acetilo das hemiceluloses presentes na casca de caroço de pêssgo.

No caso dos ácidos fórmico e levulínico, as concentrações máximas atingidas (0,65 e 0,40 g L^{-1} , respetivamente), são negligenciáveis, sendo estes produtos de degradação dos compostos furânicos.

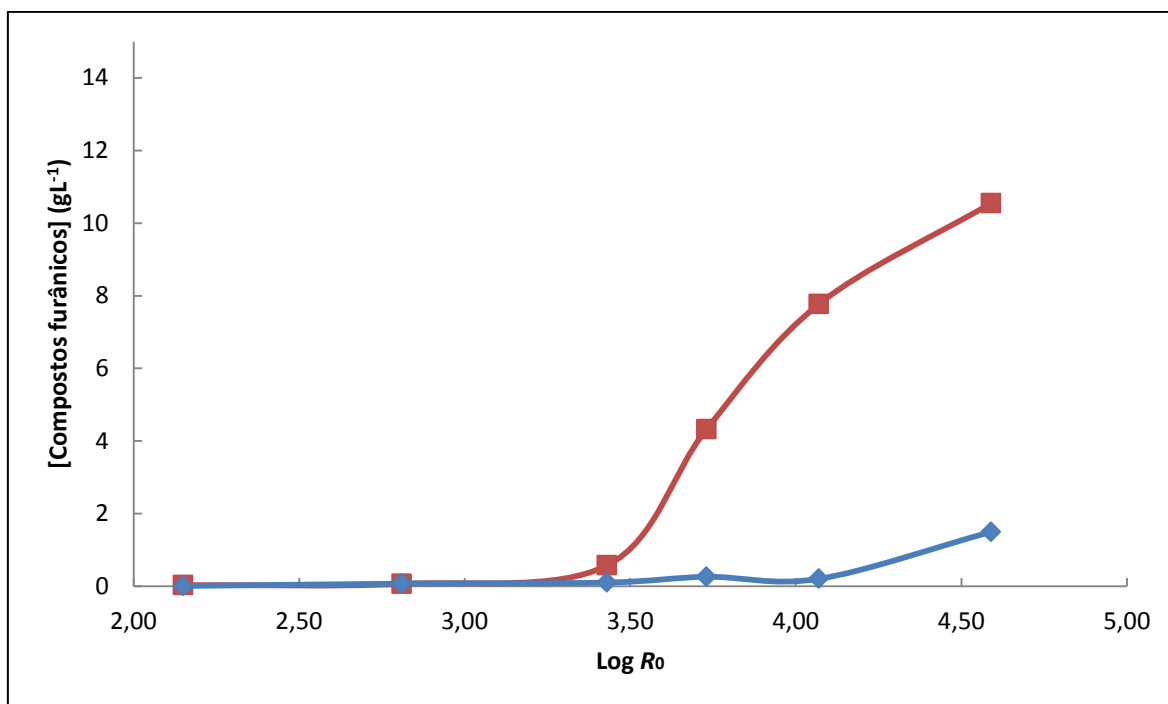


Figura 28 Perfil da concentração de compostos furânicos (■ Furfural; ♦ HMF) (gL⁻¹) em função de Log R_0 nos ensaios de auto-hidrólise da casca de caroço de pêsego

As concentrações de compostos furânicos (HMF e Furf), registadas ao longo de severidade, evidenciam a degradação dos monossacarídeos (essencialmente da xilose, justificada pelas concentrações de furfural atingidas). O aumento das concentrações de compostos furânicos, em particular do furfural, a partir das condições de severidade (Log $R_0 \geq 3,43$), reflete esse facto. Como é possível observar, a partir da condição de severidade ótima (Log $R_0 = 4,07$), a concentração dos compostos furânicos (HMF e Furf) aumenta bastante. Este facto está relacionado com a abundância de monossacarídeos hidrolisados nos licores, a partir de tal condição. Estes resultados são justificados pelo decréscimo acentuado da concentração de XOS (Figura 25) a partir da condição ótima.

Como esperado, ambos os compostos furânicos atingiram máximos de concentração para a maior condição de severidade testada, Log $R_0 = 4,59$. Para estas condições foram obtidas concentrações de 1,50 gL⁻¹, para o HMF, e de 10,55 gL⁻¹, para o Furf. Estes valores são superiores aos atingidos, normalmente nas folhosas (Abad *et al.* 1997), e superiores aos obtidos em outros resíduos agroindustriais, como a palha de trigo, para condições de severidade próximas de 4,59 (Carvalho *et al.* 2009).

Na figura seguinte (Figura 29), encontra-se apresentado o perfil da variação de pH ao longo das condições de severidade testadas.

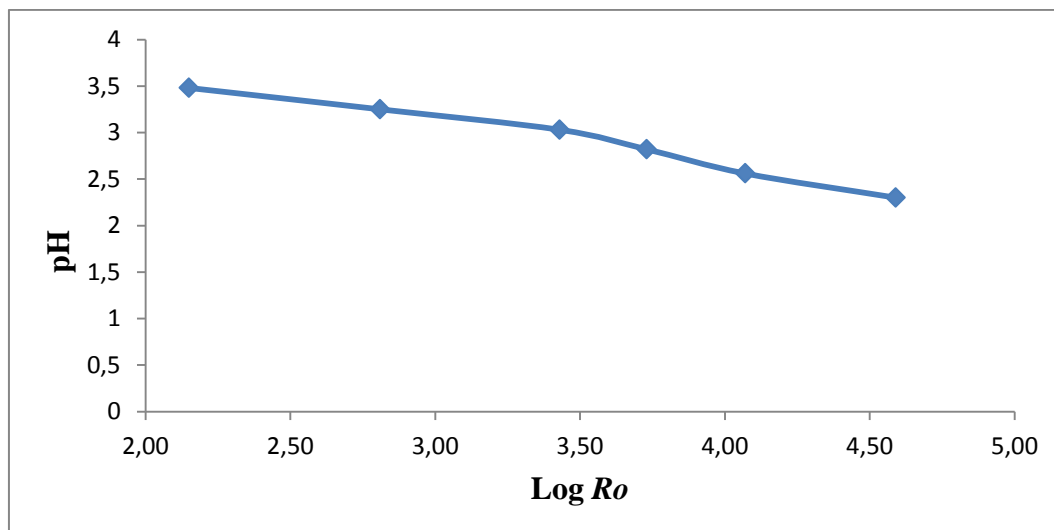


Figura 29 Perfil de pH ao longo das condições de severidade aplicadas nos ensaios de auto-hidrólise da casca de caroço de pêsego

Como é possível verificar os valores de pH diminuem com a severidade do ensaio e pode estar correlacionado com o aumento da quantidade de ácido acético (Figura 27).

Os licores de auto-hidrólise da casca de caroço de pêsego, tal como na casca de pinhão, também foram caracterizados, pelo método de Folin-Cicalteu, quanto ao seu teor em fenóis totais (Figura 30).

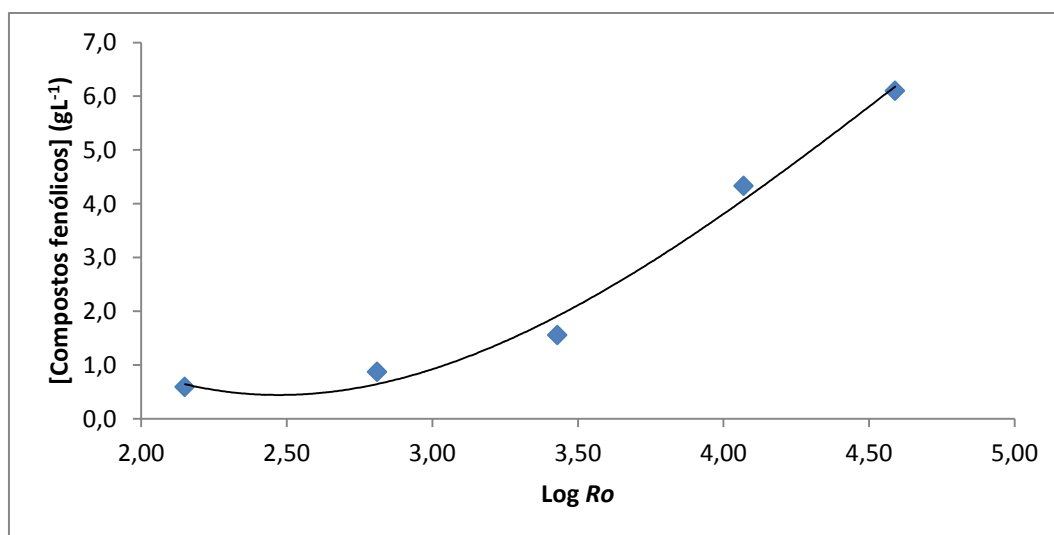


Figura 30 Perfil da concentração de compostos fenólicos (gL^{-1}) em função de Log R_0 nos ensaios de auto-hidrólise da casca de caroço de pêsego

Como era de esperar, o perfil apresentado, mostra o aumento exponencial do teor em fenóis, à medida que a condição de auto-hidrólise é mais severa. Os compostos

fenólicos atingiram máximos de concentração de $6,10 \text{ gL}^{-1}$ para a maior condição de severidade testada, $\text{Log } R_0 = 4,59$.

Os licores resultantes dos ensaios de auto-hidrólise da casca de pinhão foram analisados por CZE, de maneira a avaliar que compostos fenólicos específicos estão presentes. No quadro seguinte (quadro 12) está apresentado esquematicamente o teor relativo/comparativo dos fenóis identificados nos licores de casca de caroço de pêssgo, ao longo dos fatores de severidade obtidos.

Quadro 12 Teor relativo/comparativo dos fenóis identificados por CZE nos licores de auto-hidrólise da casca de caroço de pêssgo ao longo das condições de severidade testadas

| Composto fenólico | Log R_0 | | | | |
|-----------------------|-----------|------|------|------|------|
| | 2,15 | 2,81 | 3,43 | 4,07 | 4,59 |
| Vanilina | | | + | ++ | +++ |
| Siringaldeído | | | | + | ++ |
| Ácido vanílico | | | | + | ++ |
| Ácido sirínico | | | | + | ++ |

Pela análise do quadro 12 e reforçando a conclusão retirada da figura 30, verifica-se que à medida que as condições aplicadas no processamento, verifica-se, mais uma vez, que à medida que as condições aplicadas no processamento hidrotérmico são mais severas, maior o teor em fenóis presentes nos licores. Os compostos fenólicos identificados nos licores da casca de caroço de pêssgo foram, o siringaldeído, a vanilina, o ácido sirínico e o ácido vanílico.

3.2.1.3 BAE

Na Figura 31 está representada a composição dos licores obtidos em OS em função dos diferentes fatores de severidade aplicados nos ensaios de auto-hidrólise isotérmicos do BAE.

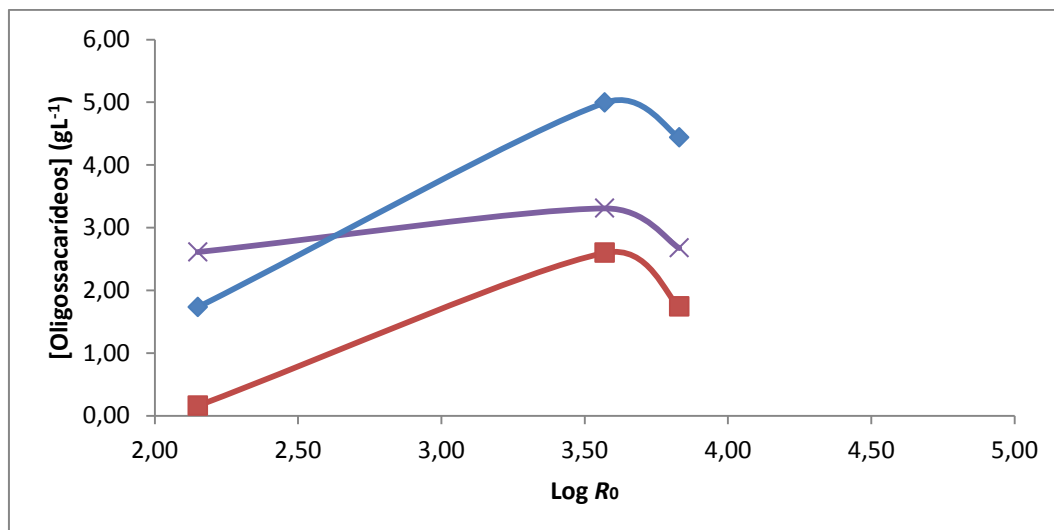


Figura 31 Perfil da concentração de oligossacarídeos (gL^{-1}) em função do $\text{Log } R_0$ nos ensaios de auto-hidrólise do BAE (×GOS ♦XOS ■AOS)

Foi estabelecida como a condição isotérmica ótima para a produção de uma maior quantidade de OS, nas hidrólises do BAE, o ponto de $\text{Log } R_0 = 3,57$, ou seja, a um tempo no isotérmico durante 2 h.

No BAE, para os OS quantificados (GOS, XOS e AOS), os máximos de concentração atingidos, correspondem à condição ótima estimada ($\text{Log } R_0 = 3,57$). A concentração máxima de GOS atingida foi de $3,31 \text{ gL}^{-1}$, de XOS foi de $4,99 \text{ gL}^{-1}$ e a de AOS foi de $2,60 \text{ gL}^{-1}$.

Nas condições mais severas empregues, devido à hidrólise dos OS nos seus componentes monoméricos, é observado um decréscimo das concentrações em OS nos licores de BAE. Assim era de esperar que as concentrações de glucose, xilose e arabinose aumentassem a partir da condição ótima ($\text{Log } R_0 = 3,57$). Este facto pode ser confirmado pela Figura 32, que mostra o perfil de concentração em monossacarídeos nos licores de BAE, em função da severidade do processo.

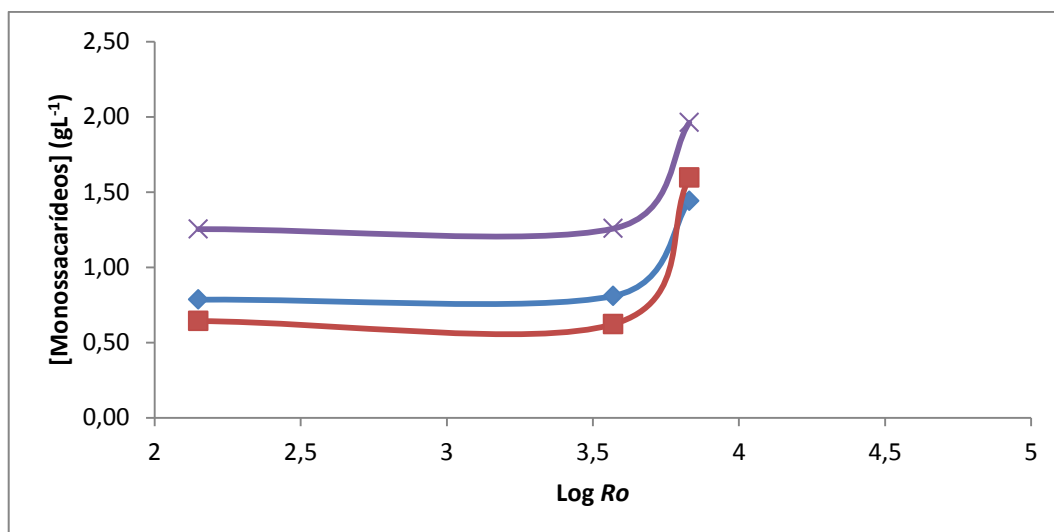


Figura 32 Perfil da concentração de monossacarídeos (× Glucose; ♦ Xilose; ■ Arabinose) (g L^{-1}) em função de $\text{Log } R_0$ nos ensaios de auto-hidrólise do BAE

Os máximos de concentração obtidos foram atingidos na maior condição de severidade testada, $\text{Log } R_0 = 3,83$. A glucose atingiu o valor máximo de $1,96 \text{ g L}^{-1}$, correspondente a um rendimento máximo de $5,15 \text{ g/100g Gn}$. A xilose atingiu o valor máximo de $1,44 \text{ g L}^{-1}$, correspondente a um rendimento de $5,09 \text{ g/100g Xn}$. A arabinose atingiu o valor máximo de $1,60 \text{ g L}^{-1}$ que corresponde a um rendimento máximo de $27,30 \text{ g/100g Arn}$.

Nas figuras seguintes (figuras 33 e 34) estão representados os perfis de concentração de ácidos alifáticos e de compostos furânicos, respetivamente, em função das condições de severidade de auto-hidrólise testadas, para o BAE.

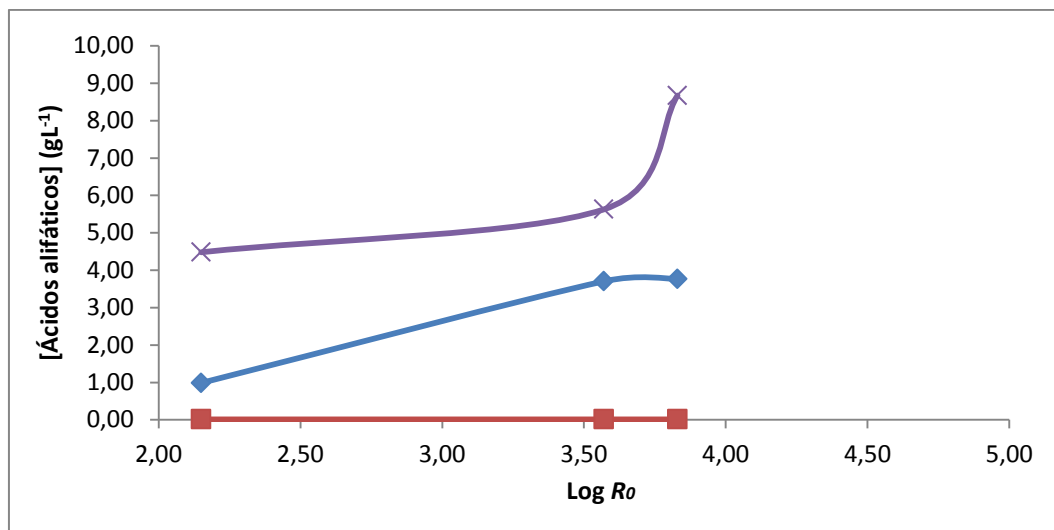


Figura 33 Perfil da concentração de ácidos alifáticos (♦ ácido fórmico; × ácido acético; ■ ácido levulínico) (g L^{-1}) em função de $\text{Log } R_0$ nos ensaios de auto-hidrólise do BAE

Era de esperar que a concentração de ácido acético aumentasse até ser obtido um rendimento igual (ou próximo) de 4,90 g/100g Ac (valor obtido na determinação da composição química do BAE – secção 3.1.1.4), na qual a partir deste valor a concentração de ácido acético deveria estabilizar. Neste trabalho, as concentrações de ácido acético, atingiram rendimentos superiores ($8,67 \text{ g L}^{-1}$, correspondente a 89,16 g/100 g Ac) aos correspondentes à solubilização dos grupos acetilo totais, presentes no BAE, tendo sido ultrapassado o rendimento máximo esperado, para a menor condição de severidade testada.

No caso do ácido fórmico, produto de degradação de compostos furânicos e monossacarídeos, a concentração máxima obtida, não justificam as concentrações de, compostos furânicos e de monossacarídeos, obtidas. As concentrações do ácido levulínico obtidas são consideradas desprezáveis, justificadas também pela pequena quantidade de HMF obtida, observada na figura seguinte.

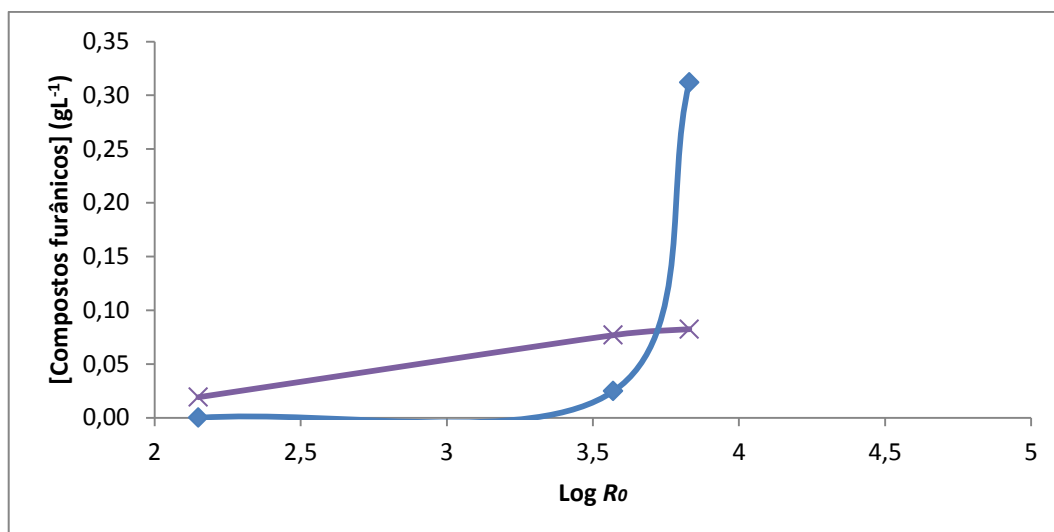


Figura 34 Perfil da concentração de compostos furânicos (♦ Furfural; × HMF) (gL⁻¹) em função de Log R_0 nos ensaios de auto-hidrólise do BAE

As concentrações de compostos furânicos obtidas espelham a degradação de monossacarídeos ao longo das condições de severidade testadas, essencialmente das pentoses (xilose e arabinose), devido ao aumento das concentrações de furfural. Foram obtidas concentrações de 0,08 gL⁻¹ de HMF e de 0,31 gL⁻¹ de F, valores muito inferiores aos comumente obtidos nas folhosas, como o eucalipto (Abad *et al.* 1997).

Tal como na casca de pinhão e de caroço de pêssego, para além da análise cromatográfica, os licores de auto-hidrólise do BAE obtidos, foram caracterizados pelo método de Folin-Cicalteu, quanto ao teor em compostos fenólicos totais (Figura 35).

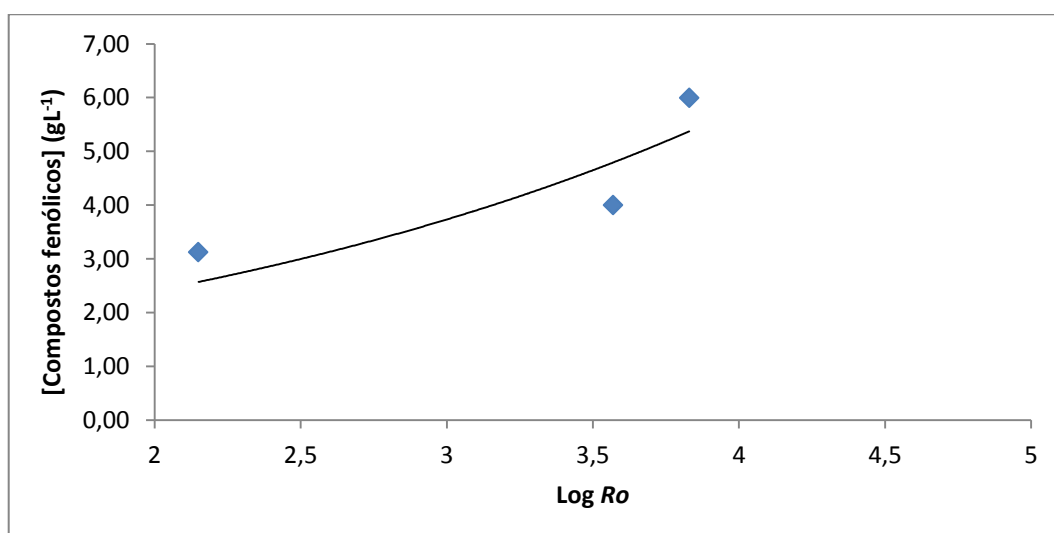


Figura 35 Perfil da concentração de compostos fenólicos (gL⁻¹) em função de Log R_0 nos ensaios de auto-hidrólise do BAE

Os licores resultantes dos ensaios de auto-hidrólise do BAE também foram analisados por CZE. No quadro seguinte (Quadro 13) está apresentado esquematicamente o teor relativo/comparativo dos fenóis identificados nos licores de BAE, ao longo das condições de severidade aplicadas.

Quadro 13 Teor relativo/comparativo dos fenóis identificados por CZE nos licores de auto-hidrólise do BAE ao longo das condições de severidade testadas

| Composto fenólico | Log R_0 | | |
|-----------------------|-----------|------|------|
| | 2,14 | 3,57 | 3,83 |
| 4-metilcatecol | ++ | ++ | +++ |
| Tirosol | + | + | + |
| Oleuropeína | | | + |

Os compostos fenólicos obtidos nos licores do BAE foram, o tirosol, o 4-metilcatecol a oleuropeína. Contudo, a oleuropeína só é identificada na condição mais severa (Log $R_0 = 3,83$).

3.2.1.4 Sementes de anona

Na Figura 36 está representada a composição dos licores obtidos em OS em função dos diferentes fatores de severidade aplicados nos ensaios de auto-hidrólise não-isotérmicos das sementes de anona.

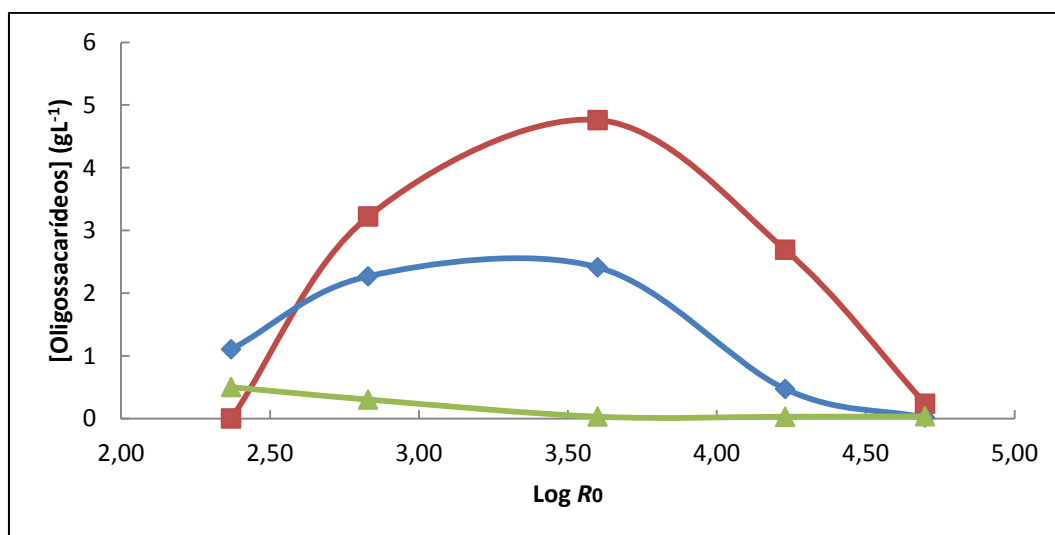


Figura 36 Perfil da concentração de oligossacarídeos (g L^{-1}) em função do Log R_0 nos ensaios de auto-hidrólise das sementes de anona (■ XOS ◆ GOS ▲ AOS)

Foi estabelecida como a condição ótima de temperatura para a produção de uma maior quantidade de OS, a partir de sementes de anona, o ponto de Log $R_0 = 3,60$, ou seja a 190°C (Quadro 10).

O aumento de concentração de OS (essencialmente GOS e XOS) nos licores ocorre até serem atingidos máximos de concentração de $2,41 \text{ gL}^{-1}$ e de $4,46 \text{ gL}^{-1}$, respetivamente. Os resultados obtidos para os AOS são negligenciáveis (concentrações máximas próximo de zero).

Para condições mais severas dá-se a diminuição das concentrações de OS, devido à hidrólise dos mesmos, nos seus componentes monoméricos e o perfil de concentração, em monossacarídeos, dos licores das sementes de anona, em função da severidade do processo, está apresentado na Figura 37.

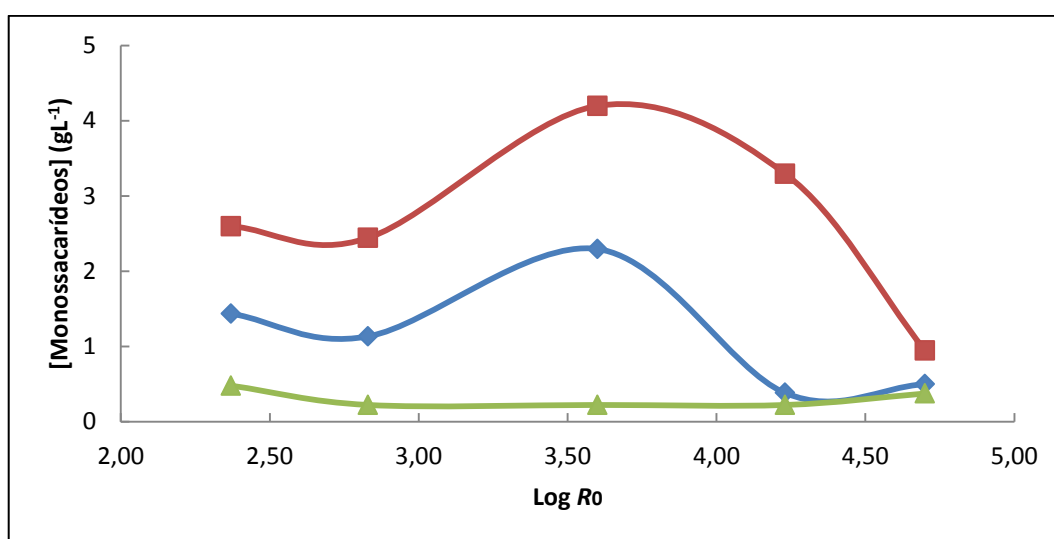


Figura 37 Perfil da concentração de monossacarídeos (■ Xilose; ◆ Glucose; ▲ Arabinose) (gL^{-1}) em função de Log R_0 nos ensaios de auto-hidrólise das sementes de anona

O decréscimo das concentrações em GOS e XOS nos licores é observado para severidades superiores a 3,60, deste modo, era de esperar um aumento da concentração de glucose e xilose a partir de tal condição. Contudo, tal facto não é o observado, podendo ser observado o decaimento das concentrações de Glc e Xyl, a partir da condição ótima (Log $R_0 = 3,60$). Estes dados experimentais podem ser explicados pela presença de monossacarídeos não quantificados por HPLC, como a manose e a galactose, que contribuem para a área elevada do pico da xilose, pois têm tempos de retenção muito próximos. Outra explicação é a conversão dos monossacarídeos nos seus produtos de degradação – ácidos alifáticos e compostos furânicos.

A concentração máxima atingida para a glucose foi de $2,29 \text{ gL}^{-1}$ (correspondente a $5,04 \text{ g/100g Gn}$). A concentração máxima atingida de xilose foi de $4,20 \text{ gL}^{-1}$, que corresponde a $13,77 \text{ g/100g Xn}$.

Nas figuras 38 e 39 estão representados os perfis de concentração de ácidos alifáticos e de compostos furânicos, respetivamente, em função das condições de severidade de auto-hidrólise testadas, para as sementes de anona.

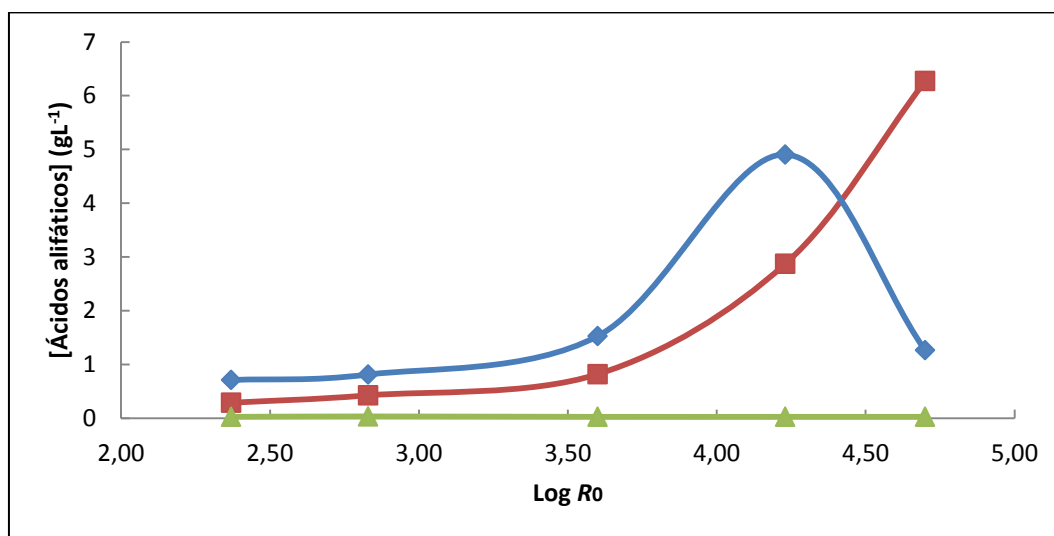


Figura 38 Perfil da concentração de ácidos alifáticos (■ ácido fórmico; ◆ ácido acético; ▲ ácido levulínico) (gL^{-1}) em função de $\text{Log } R_0$ nos ensaios de auto-hidrólise das sementes de anona

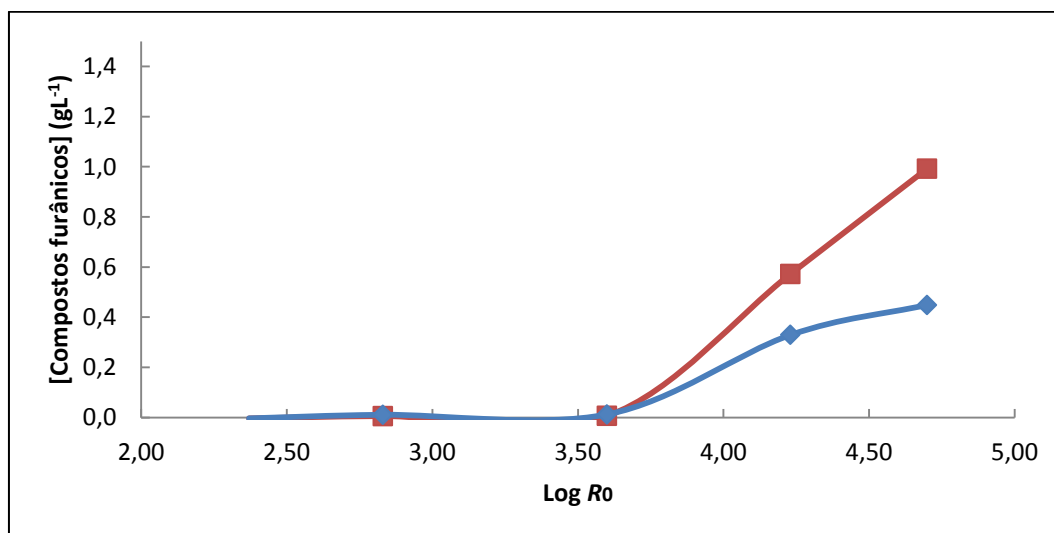


Figura 39 Perfil da concentração de compostos furânicos (■ Furfural; ◆ HMF) (g/L) em função de $\text{Log } R_0$ nos ensaios de auto-hidrólise das sementes de anona

As concentrações de compostos furânicos (HMF e Furf), registadas ao longo de severidade, evidenciam a degradação dos monossacarídeos (glucose e xilose), como é

verificado pelo aumento das concentrações dos compostos furânicos a partir da condição ótima ($\text{Log } R_0 = 3,60$), valor a partir da qual se inicia a degradação dos monossacarídeos (Figura 37), que está associada à abundância de polissacarídeos dissolvidos nos licores. Estes resultados também são justificados pelo decréscimo acentuado da concentração de GOS e XOS (Figura 25) a partir da condição de severidade ótima estimada.

As elevadas concentrações de ácido fórmico podem ser justificadas pela degradação de monossacarídeos, apesar de não justificar as concentrações de compostos furânicos obtidas. Tais concentrações podem estar relacionadas com a co-eluição de outros compostos juntamente com os ácidos alifáticos.

Como esperado, ambos os compostos furânicos atingiram máximos de concentração para a maior condição de severidade testada, $\text{Log } R_0 = 4,70$. Para estas condições foram obtidas concentrações de $0,45 \text{ gL}^{-1}$ para o HMF, e de $0,99 \text{ gL}^{-1}$, para o Furf. Os valores de concentração de HMF obtidos estão de acordo com os valores comuns para as folhosas, no entanto, as concentrações de furfural são muito inferiores às normalmente obtidas. As concentrações atingidas por ambos os compostos furânicos são superiores às obtidas durante o fracionamento de outros resíduos agroindustriais (Carvalho *et al.* 2009).

Os licores de auto-hidrólise das sementes de anona também foram caracterizados, quanto ao seu teor em fenóis, pelo método de Folin-Cicalteu (Figura 40).

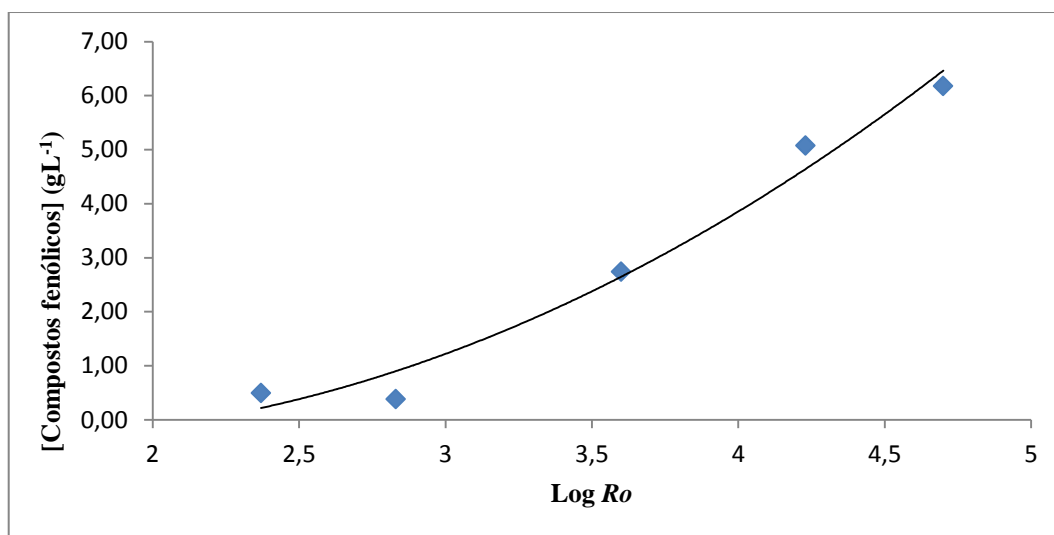


Figura 40 Perfil da concentração de compostos fenólicos (gL^{-1}) em função de $\text{Log } R_0$ nos ensaios de auto-hidrólise das sementes de anona

Como era de esperar, também na anona, a concentração de compostos fenólicos aumenta, à medida que a condição de auto-hidrólise é mais severa. Os compostos fenólicos

atingiram máximos de concentração de $6,18 \text{ gL}^{-1}$ para a maior condição de severidade testada, $\text{Log } R_0 = 4,70$. Tal como para os outros materiais, os licores resultantes dos ensaios de auto-hidrólise das sementes de anona, foram analisados por CZE e único composto fenólico identificado foi a vanilina, no entanto, este composto, só começa a aparecer a fatores de severidade superiores a 3,60.

3.2.2 Estudo comparativo da composição em oligossacarídeos dos licores obtidos na auto-hidrólise

Na figura seguinte (Figura 41), encontra-se representada a variação da composição, em GOS (g/100g Gn), resultante de todos os licores obtidos durante a auto-hidrólise dos quatro materiais, em função do fator de severidade empregue

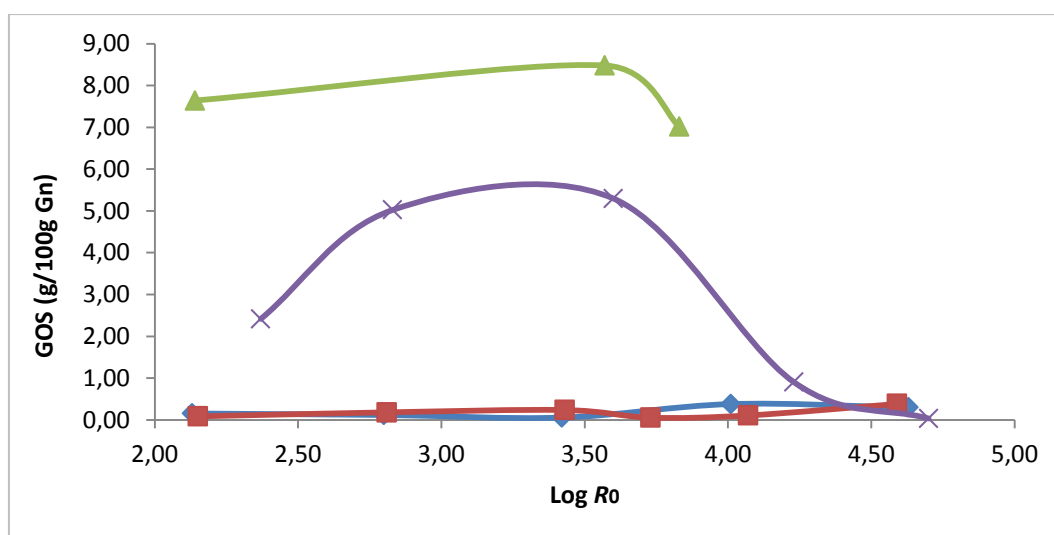


Figura 41 Variação da composição dos licores em GOS (g/100g Gn) em função do $\text{Log } R_0$ resultantes dos ensaios de auto-hidrólise da \blacklozenge casca de pinhão; \blacksquare casca de caroço de pêssgo; \blacktriangle BAE e \times sementes de anona

Como é possível visualizar, dos materiais estudados, neste trabalho, o BAE é o material que permite a obtenção de maior quantidade de GOS, mesmo para severidades mais baixas, no entanto, apenas se obtiveram rendimentos máximos de $8,48 \text{ g/100g Gn}$. Nas sementes de anona, os GOS, apesar de serem produzidos em menor quantidade do que no BAE, é ainda assim, capaz de produzir maior quantidade de GOS que a casca de pinhão e a casca do caroço de pêssgo, cujos valores de GOS se aproximam de zero, podendo ser desprezáveis. Quanto aos valores de rendimentos obtidos não se encontram descritos na bibliografia, no entanto os valores obtidos são baixos, não se podendo considerar viável a produção de GOS a partir destes materiais.

Na Figura 42 encontra-se representada a variação da composição, em XOS (g/100g Xn), resultante de todos os licores obtidos durante a auto-hidrólise dos quatro materiais, em função do fator de severidade empregue.

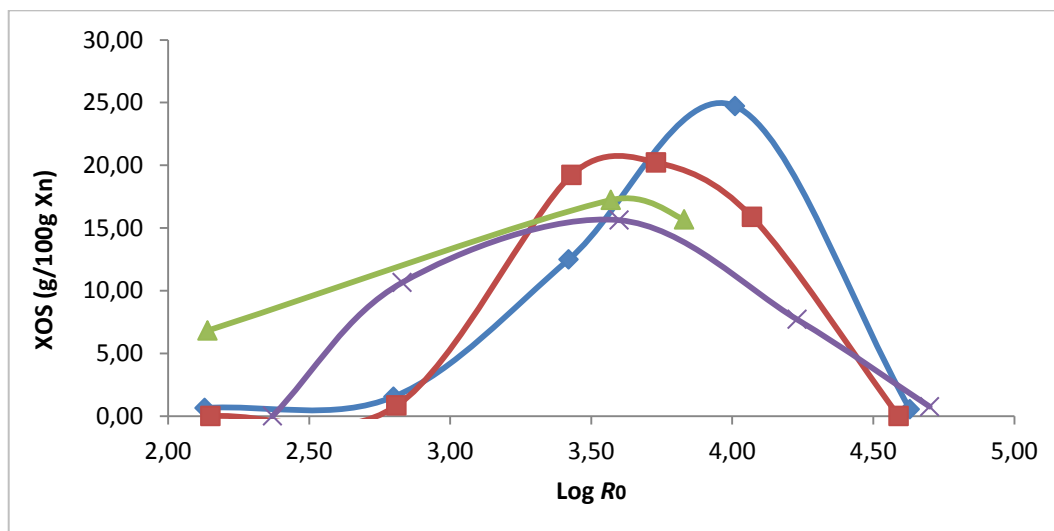


Figura 42 Variação da composição dos licores em XOS (g/100g Xn) em função do Log R₀ resultantes dos ensaios de auto-hidrólise da ♦ casca de pinhão; ■ casca de caroço de pêssigo; ▲ BAE e × sementes de anona

É possível observar que os XOS são os OS mais produzidos a partir das novas fontes estudadas. No entanto, as suas concentrações variam de material para material, ao longo da severidade testada. Para o BAE e para as sementes de anona, é possível observar que se atingem rendimentos em XOS máximos (17,23 g/100g Xn no caso do BAE e 15,62 g/100g de Xn nas sementes de anona), em condições de severidade muito próximas (3,57 no BAE e 3,60 nas sementes de anona) e baixas, quando comparados com a casca de pinhão e a casca de caroço de pêssigo. Nestes dois últimos materiais atingem-se rendimentos em XOS superiores (21,98 g/100g Xn no caso do pinhão e 20,23 g/100g Xn no caso do caroço de pêssigo) aos obtidos a partir do BAE e das sementes de anona (Log R₀ 4,01 na casca de pinhão e 4,07 na casca de caroço de pêssigo).

Estes rendimentos em XOS obtidos são muito inferiores aos descritos na literatura. Na bibliografia são descritos rendimentos em XOS de cerca de 95 g/100g Xn, obtidos a partir de resíduos de milho, e de 61g/100g Xn a partir da dreche cervejeira (Carvalho *et al.* 2004, Moniz *et al.* 2013). Tais valores de rendimentos inferiores podem estar relacionados com a RLS usada neste trabalho, que foi a mais baixa possível para todos os materiais. Na literatura os elevados rendimentos foram obtidos a RLS (m/m) de 10 e 8,

para os resíduos de milho e de dreche cervejeira, respetivamente (Carvalho *et al.* 2004, Moniz *et al.* 2009).

Industrialmente, o gasto energético para produção destes XOS, seria superior no caso das cascas de pinhão e de caroço de pêssgo, uma vez que, é necessário a aplicação de condições mais severas para a sua produção. Contudo, o rendimento em XOS obtidos a partir destes materiais, traduz-se numa vantagem para a biorrefinaria, pois são superiores aos obtidos no BAE e nas sementes de anona.

Na Figura 43 encontra-se representada a variação da composição, em grupos acetilo (g/100g Ac), dos OS obtidos durante a auto-hidrólise dos quatro materiais, em função do fator de severidade empregue.

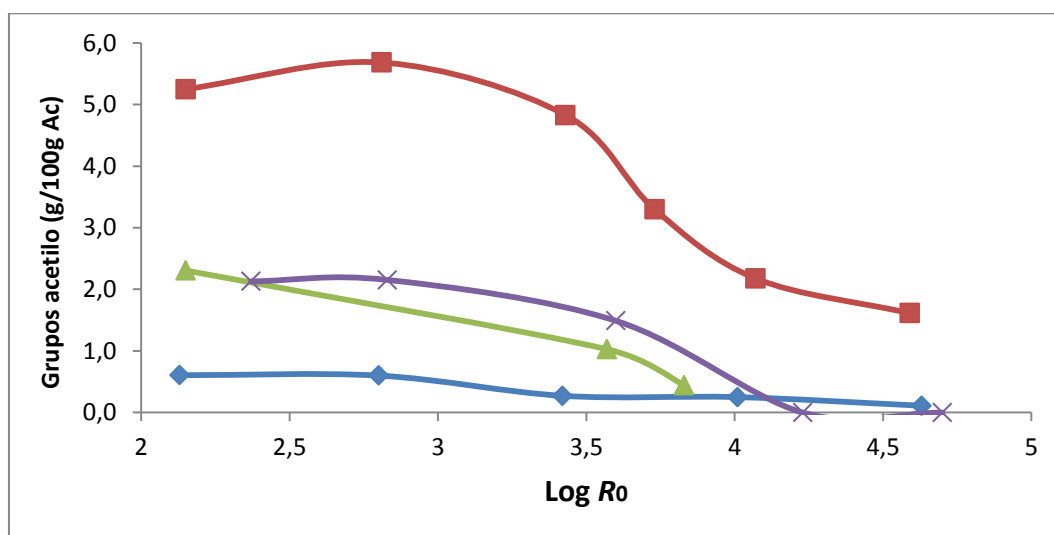


Figura 43 Variação do teor em grupos acetilo (g/100g Ac) dos OS em função do Log R_0 resultantes dos ensaios de auto-hidrólise da ♦ casca de pinhão; ■ casca de caroço de pêssgo; ▲ BAE e × sementes de anona

Como é possível observar a composição dos OS em grupos acetilo diminui, ao longo da auto-hidrólise.

Interpretando todos os resultados, descritos anteriormente, é possível concluir que para a casca de pinhão foram obtidos OS com concentrações máximas de $15,40 \text{ gL}^{-1}$, contendo xilose, galactose e manose com grupos OH acetilados, como esperado para as resinosas. Para a casca do caroço de pêssgo foram obtidos essencialmente AcXOS (xilo-oligossacarídeos com grupos OH acetilados) em concentrações máximas de $26,90 \text{ gL}^{-1}$. A partir do BAE foram obtidos OS em concentrações de $12,00 \text{ gL}^{-1}$ contendo glucose, xilose

e arabinose também com grupos acetilados e a partir das sementes de anona foram obtidos essencialmente GOS e XOS, com concentrações que atingiram máximos de 8,99 gL⁻¹.

3.2.3 Efeito da composição do hidrolisado na pressão do sistema

A fim de relacionar as temperaturas de cada um dos ensaios de auto-hidrólise e os valores de pressão atingidos no reator, foram estimados, com base em resultados experimentais, os três parâmetros da equação de Antoine (equação 5),

$$\log_{10}P = A - \frac{B}{C+T} \quad (\text{Equação 5})$$

Recorrendo a estes parâmetros, é possível ajustar curvas de pressão em função da temperatura, aos resultados experimentais obtidos, sendo possível prever o valor de pressão atingido em cada ensaio. Esta ferramenta é importante para o *scale-up* do processo para a escala industrial.

Foram realizados ensaios com água (quer não-isotérmicos, quer isotérmicos), para os quais foram estimados os parâmetros da equação de Antoine, a fim de garantir a eficácia dos ajustes e avaliar a influência da mistura entre os materiais e a água. Os perfis de temperatura e pressão foram comparados com os obtidos durante os processos de auto-hidrólise, para cada um dos materiais.

Na figura seguinte (Figura 44) estão apresentados os perfis de pressão (Bar) em função da temperatura (K), para cada um dos materiais, em comparação com os perfis dos ensaios realizados com água.

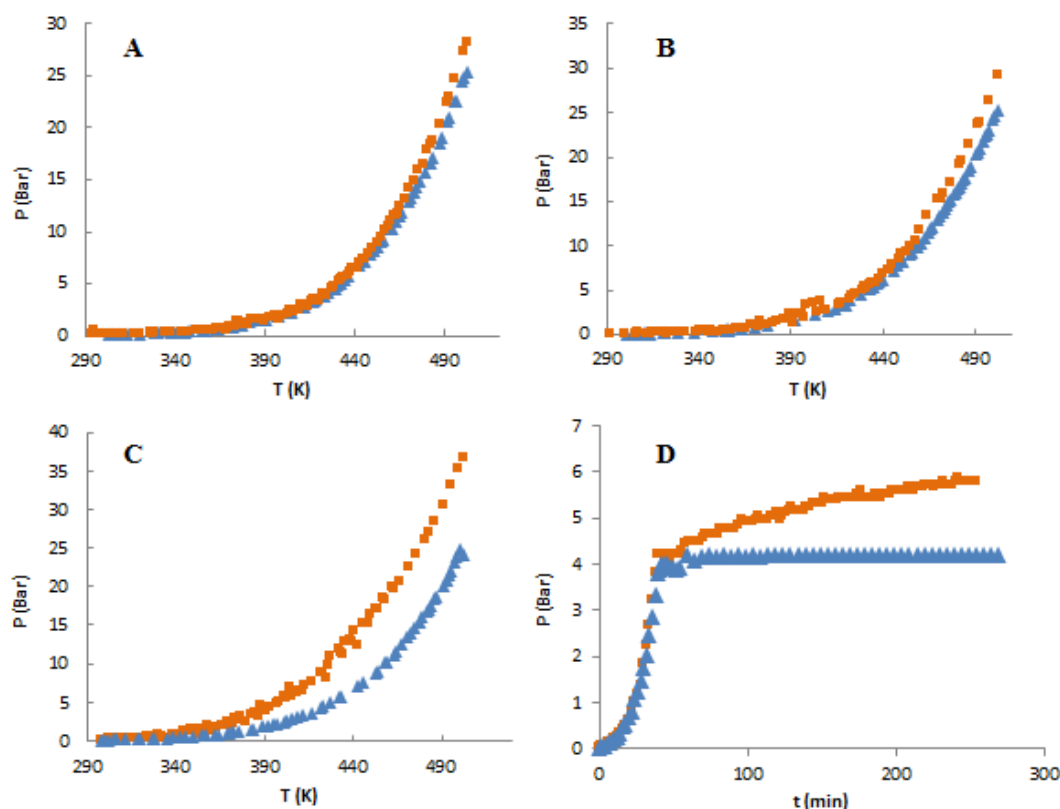


Figura 44 Perfis de pressão (Bar) em função da temperatura (K), obtidos nos ensaios de auto-hidrólise de: A) casca de pinhão; B) Casca de caroço de pêssogo; C) Sementes de anona e D)BAE (■ – Pressão nos ensaios de auto-hidrólise e ▲ – Pressão nos ensaios com água).

Como é possível visualizar, para valores mais baixos de temperatura e tempo (figura 44 - D) os perfis, de pressão dos ensaios com água e dos ensaios de auto-hidrólise, obtidos encontram-se praticamente sobrepostos, independentemente do material usado. No entanto, com o decorrer do processo, as diferenças entre as curvas vão ficando cada vez mais acentuadas. Este facto é observado para todos os materiais, apesar de atingir diferenças de pressão, maiores ou menores, consoante o material usado.

É possível verificar que a casca de pinhão, a casca de caroço de pêssogo e atingem valores de pressão pouco superiores aos da água, sendo os perfis dos ensaios de auto-hidrólise e de ensaios com água quase sobrepostos. Nas sementes de anona e no BAE observam-se maiores variações de pressão (ΔP) entre os ensaios de auto-hidrólise e os ensaios apenas com água.

Estas diferenças entre os valores de pressão foram quantificados e relacionados com o somatório das concentrações de compostos voláteis, presentes nos licores de cada ensaio de auto-hidrólise. A figura 45 representa a relação entre as diferenças de pressão

(Bar) em função das concentrações (g/L^{-1}) dos compostos voláteis obtidos em cada ensaio, para cada material.

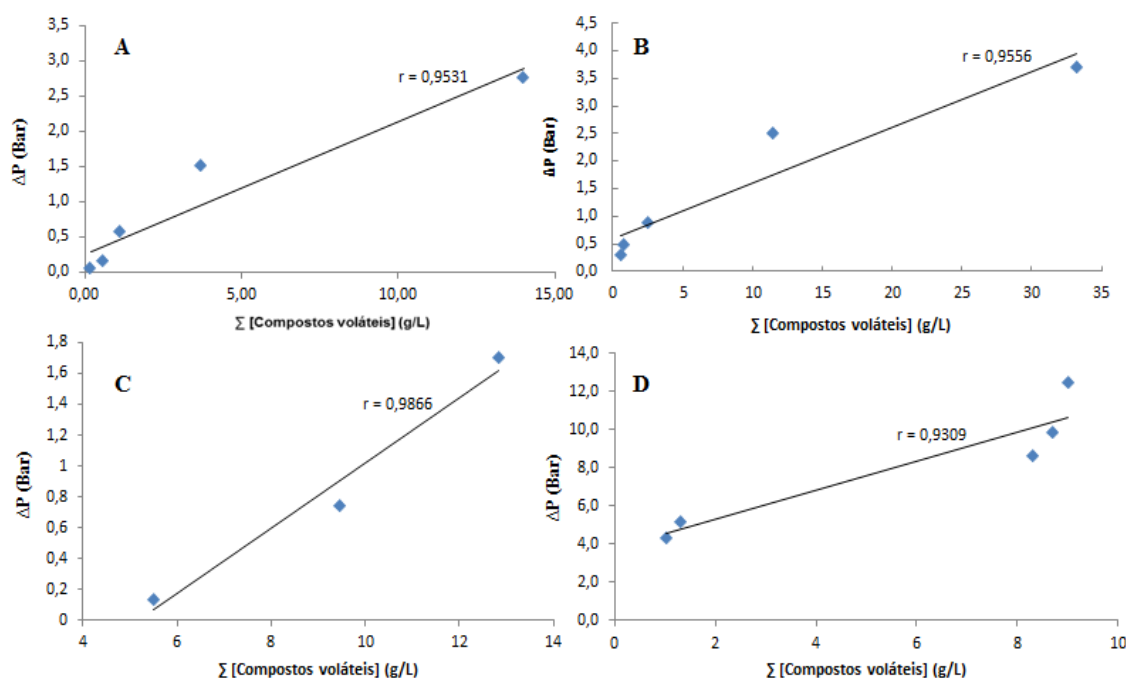


Figura 45 Correlação das variações de pressão obtidas, entre os ensaios de auto-hidrólise e os ensaios com água, em função da concentração de compostos voláteis (g/L) presentes nos licores de A) Casca de pinhão; B) Casca de caroço de pêssogo; C) BAE e D) Sementes de anona

Perante a análise da figura, é possível admitir que as diferenças entre os valores de pressão obtidos para temperaturas iguais devem-se ao aumento da composição, em compostos voláteis, nos licores de auto-hidrólise. Assim, tendo por base os valores do coeficiente de correlação obtido, é possível afirmar a existência de uma correlação muito significativa entre as diferenças de pressão e as concentrações de compostos voláteis presentes.

Esta informação é muito relevante para efeito de controlo *on-line* do processo, podendo ser utilizado como base para o desenvolvimento de um KBCS (*Knowledge Based Control System*), ou seja, de um sistema de monitorização e controlo da reação, com grande potencial, para a automatização do processo ao nível industrial, pois permite estimar a evolução da reação de auto-hidrólise através de uma simples leitura de pressão.

3.2.4 Caracterização química dos sólidos resultantes

Nesta secção, de modo a confirmar a eficácia da auto-hidrólise e o seu impacto nos diferentes materiais, foi determinada a composição dos sólidos resultantes dos ensaios hidrotérmicos apresentados na secção 3.2.1.

Na Figura 46 é apresentada a composição em glucanas, xilanas, arabinanas, grupos acetilo, LK e cinza, em função das condições de severidade aplicadas nos ensaios de auto-hidrólise para os diferentes materiais estudados.

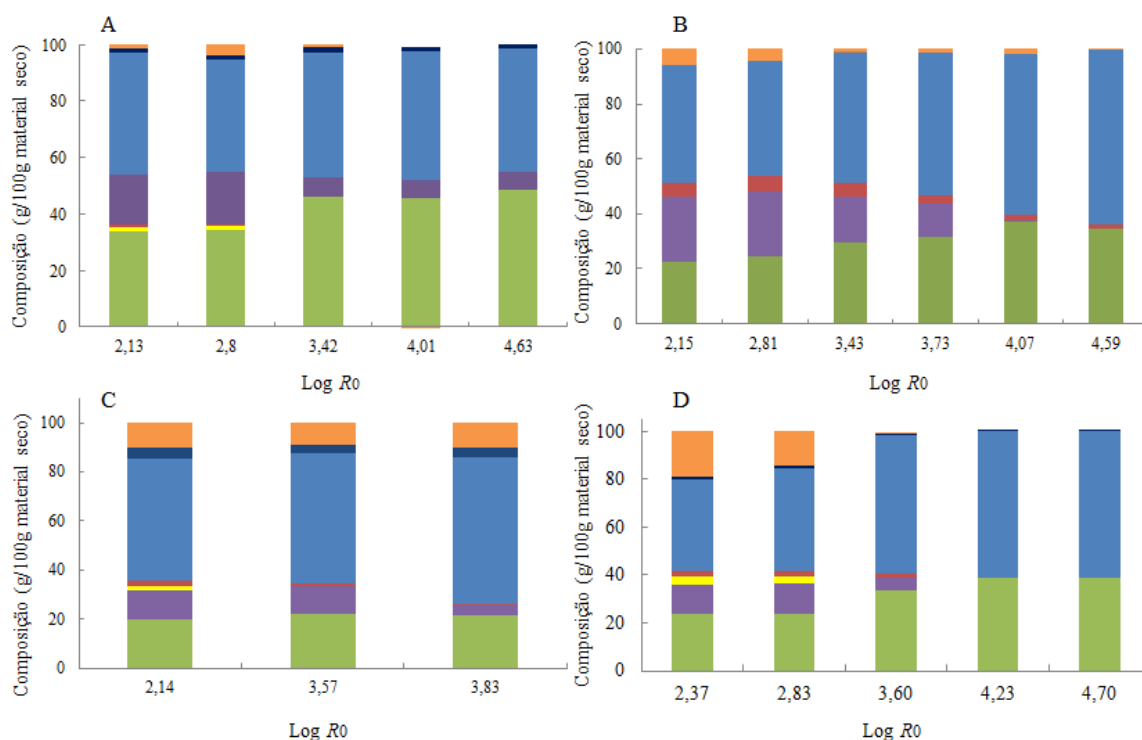


Figura 46 Composição dos resíduos sólidos (g/100g material seco) obtidos nos ensaios de auto-hidrólise da casca de pinhão (A), casca de caroço de pêssgo (B), BAE (C) e das sementes de anona (D), em função do Log R_0 (■ glucanas, ■ xilanas, ■ arabinanas ■ grupos acetilo, ■ LK, ■ cinza e ■ outros)

É possível observar que, para condições de severidade mais baixas ($\text{Log } R_0 \leq 3,60$), a composição dos resíduos sólidos resultantes dos ensaios de auto-hidrólise de todos os materiais, à exceção do BAE, é semelhante à composição inicial dos mesmos, caracterizada na secção 3.1.1.4. Este perfil é confirmado pelos baixos rendimentos em OS (Figura 19 - casca de pinhão, Figura 25 - casca de caroço de pêssgo, Figura 31 - BAE e Figura 36 - sementes de anona) e em material solubilizado (Figura 18), registados a essas condições mais baixas. No caso do BAE, a ocorrência da solubilização da fração hemicelulósica no início do processamento hidrotérmico, justifica as concentrações

superiores atingidas de OS (Figura 31) a esta condição, quando comparadas às concentrações de OS obtidas, à mesma condição, para as cascas.

A partir da condição ótima estimada para cada material, para produção de maior quantidade de OS, é visível a remoção progressiva das hemiceluloses e dos grupos acetilo presentes, sendo evidente a remoção completa das hemiceluloses no caso da casca de caroço de pêssgo e das sementes de anona.

Numa tendência inversa, verifica-se um aumento do conteúdo em glucanas e de LK, nos resíduos sólidos, ao longo do processamento hidrotérmico. Ao contrário das glucanas, apenas parcialmente solubilizadas (18% na casca de pinhão, 12% na casca de caroço de pêssgo, 2% no BAE e 17% nas sementes de anona), a LK é completamente recuperada na fase sólida, no final da otimização das condições de hidrólise.

Deste modo, o método hidrotérmico de auto-hidrólise revela-se um processo com elevada seletividade para a hidrólise das hemiceluloses, presentes nas sementes de frutas estudadas, cuja remoção é também fundamental para a eficácia dos ensaios enzimáticos.

Para estudar a celulose (avaliada como glucana) resultante do processamento hidrotérmico e para demonstrar o efeito positivo que a extensão do processo de auto-hidrólise tem, sobre o aumento da digestibilidade enzimática, foram realizados ensaios de hidrólise enzimática.

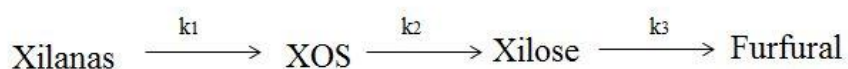
3.3 Modelação matemática da hidrólise das hemiceluloses

Os mecanismos associados à hidrólise dos materiais lenhocelulósicos podem ser traduzidos numa sequência de reações químicas interdependentes entre si. Tendo por base essas reações, é possível estabelecer um modelo matemático capaz de traduzir a cinética do processo de auto-hidrólise utilizando-se um sistema de equações diferenciais com base num balanço de massa às espécies envolvidas no processo.

A modelação dos dados experimentais teve como ponto de partida um modelo proposto na literatura para a auto-hidrólise de resíduos de eucalipto em condições não isotérmicas (Garrote *et al.* 2002). Os OS são produzidos a partir de uma fração de xilana suscetível à hidrólise, dando origem a OS hidrolisáveis a monómeros, que por sua vez é degradada em furfural, e outros produtos de degradação (ver secção 1.4.2).

Considera-se um sistema pseudo-homogéneo, que as reações são irreversíveis e apresentam uma cinética de primeira ordem, cujas constantes cinéticas (k_1 a k_3) são função da temperatura de acordo com a equação de Arrhenius.

Em seguida, no que diz respeito à solubilização das hemiceluloses em OS, o modelo proposto por Garrote foi adaptado e simplificado para os dados experimentais obtidos no decorrer deste trabalho. Assim, e face aos resultados obtidos na caracterização dos resíduos sólidos, foi considerada apenas a presença de uma fração de hemicelulose, e uma única fração de OS, independente do seu peso molecular.



Tratando-se de uma cinética de primeira ordem, a constante cinética é linearmente dependente da concentração da espécie que é consumida ou produzida e, para o caso das hemiceluloses, a sua degradação em função do tempo pode ser traduzida matematicamente por:

$$\frac{dHemicel}{dt} = -k_1 \cdot Xn \quad (\text{Equação 6})$$

Esta expressão, ao ter em conta a equação de Arrhenius, pode ser reescrita como:

$$\frac{dHemicel}{dt} = -k_0 \cdot \exp \left[\frac{-Ea_1}{R \cdot T(t)} \right] \cdot Hemicel \quad (\text{Equação 7})$$

A temperatura não é constante durante os tratamentos, dado que a reação é levada a cabo em condições não isotérmicas, para todos os materiais à exceção do BAE (processado a condições isotérmicas). Dado que a variação da temperatura em função do tempo apresenta uma tendência linear, como pode ser confirmado pelos perfis de temperatura do reator apresentados na Figura 15, o termo $T(t)$ pode ser substituído pela expressão $T = \alpha \cdot t + \beta$, na qual α representa o declive da reta da temperatura e β a sua ordenada na origem. Substituindo, vem que:

$$\frac{dHemicel}{dt} = -k_0 \cdot \exp \left[\frac{-Ea_1}{R \cdot (\alpha \cdot t + \beta)} \right] \cdot Hemicel \quad (\text{Equação 8})$$

Do mesmo modo, o passo reacional seguinte do modelo, ou seja a formação de OS, pode ser descrito pela expressão:

$$\frac{dOS}{dt} = k_0 \cdot \exp \left[\frac{-Ea_1}{R \cdot (\alpha \cdot t + \beta)} \right] \cdot Hemicel - k_0 \cdot \exp \left[\frac{-Ea_2}{R \cdot (\alpha \cdot t + \beta)} \right] \cdot OS \quad \text{(Equação 9)}$$

De forma análoga podem-se desenvolver as equações para os monossacáridos e para o furfural e outros produtos de degradação.

A integração analítica do sistema foi levada a cabo, tendo-se obtido uma expressão bastante complexa, devido à natureza não isotérmica do sistema, ao contrário do que acontece para modelos para condições isotérmicas, por exemplo para a auto-hidrólise da drecche cervejeira (Carvalho *et al.* 2005). Assim, de maneira a simplificar o tratamento matemático optou-se por, proceder a uma resolução numérica do modelo de equações diferenciais. Utilizou-se ao método de integração de Euler (Joswig 2005) e a ferramenta *solver* do *MS Excel* para estimar os parâmetros envolvidos, por ajuste aos dados experimentais.

No que diz respeito aos OS, os dados experimentais poderão estar subvalorizados, uma vez que são calculados indiretamente através da diferença entre os monómeros quantificados nos licores e obtidos depois da sua hidrólise ácida, havendo por isso alguma degradação associada. Tal facto, deve-se também à simplicidade do modelo, uma vez que, este não considera a degradação de OS em ácido acético (Nabarlatz *et al.* 2004), bem como, em outros monossacarídeos não identificados, como o exposto em 3.2.1.

Na figura seguinte (figura 47), encontra-se apresentado, como exemplo, o perfil de auto-hidrólise para em função do tempo de reação durante o processo não isotérmico, para a casca de caroço de pêssgo.

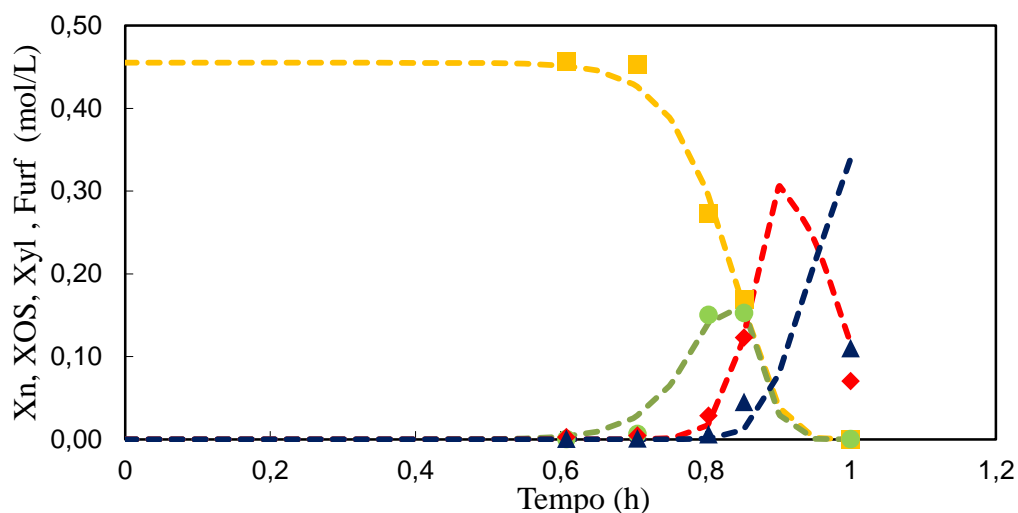


Figura 47 Ajuste do modelo proposto (---) aos dados experimentais obtidos para a casca de caroço de pêssogo (xilanas ■, XOS ●, xilose ◆ e furfural ▲, (mol/L) em função do tempo)

No quadro seguinte (Quadro 14) são apresentados os fatores pré-exponenciais (K_0) e energias de ativação (kJ/mol) determinadas para o modelo proposto para a conversão das hemiceluloses em OS, no processamento hidrotérmico de todos os materiais.

Quadro 14 Parâmetros determinados para o modelo proposto para os diferentes materiais

| | Casca de pinhão | Sementes de anona | BAE* | Casca de caroço de pêssogo |
|-------------------------------|-----------------|-------------------|--------|----------------------------|
| $\ln K_0$ (h^{-1}) | 15,38 | 29,67 | 27,84 | 41,38 |
| E_{a1} (kJ/mol) | 54,74 | 99,68 | 105,70 | 152,90 |

*Dados calculados para condições não isotérmicas (Bernardo 2011)

A comparação entre os parâmetros estimados neste trabalho com a literatura deve ser cuidadosa, pois os valores não são apenas influenciados pela topologia do modelo, mas também pelas condições experimentais utilizadas nos diferentes ensaios (nomeadamente razão-líquido sólido, granulometria, etc.), pelo que se opta por apenas ser feita uma comparação em relação à despolimerização das hemiceluloses em OS.

Ao comparar os resultados obtidos com os da literatura, para outros resíduos agroindustriais (Conner 1984, Aguilar *et al.* 2002, Carvalheiro *et al.* 2005), são obtidos parâmetros bastante semelhantes que atestam a validade do modelo proposto. Destaca-se a casca de pinhão que apresenta valores para estes parâmetros muito inferiores aos restantes materiais, o que é certamente uma consequência da sua natureza biológica.

A partir destes modelos é possível efetuar simulações simples para otimização das condições reacionais do processo hidrolítico que são determinante para um *scale-up*

adequado do processo, tanto à escala de demonstração, como numa fase comercial posterior. Neste trabalho, os parâmetros obtidos do ajuste dos dados para a auto-hidrólise não-isotérmica do BAE (Bernardo 2011) foram utilizados para descrever os dados obtidos, tendo-se obtido um bom ajuste, o que valida a aplicação desta estratégia (figura 48).

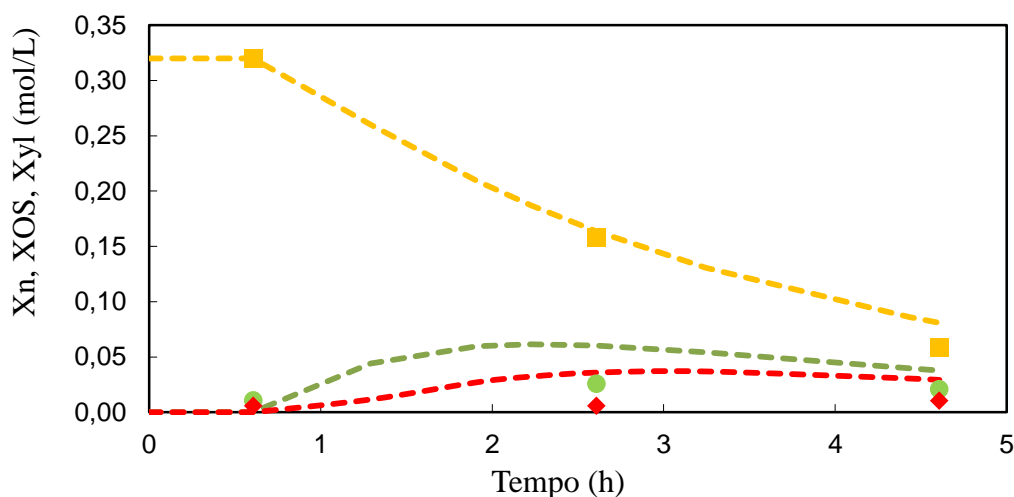


Figura 48 Ajuste do modelo proposto obtido a partir dos dados de (Bernardo 2011) aos dados experimentais obtidos para o BAE neste trabalho (xilanas ■, XOS ●, xilose ◆ (mol/L) em função do tempo)

A figura seguinte (figura 49) representa a variação dos valores das constantes de velocidade de reação (k), estimadas com base no modelo de Arrhenius, para cada material, ao longo do processo.

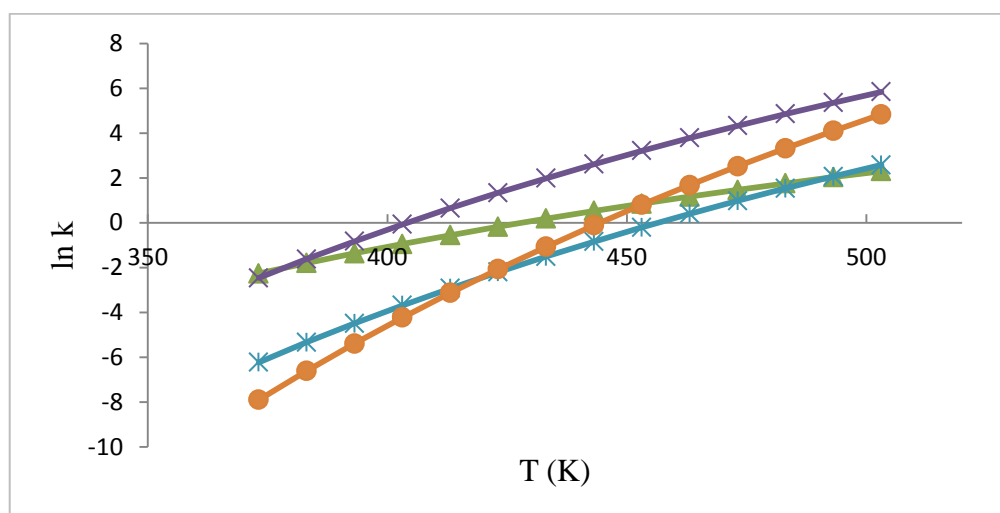


Figura 49 Variação da constante de velocidade de reação (h^{-1}) para a casca de pinhão (▲), casca de caroço de pêssego (●), BAE (x) e sementes de anona (x), em função da temperatura (K)

Pela figura é possível verificar, mais uma vez, o comportamento distinto dos materiais, durante a auto-hidrólise. Como é possível observar na fase inicial do processamento hidrotérmico a casca de caroço de pêssgo e o BAE, têm valores de k inferiores. No entanto, como o decorrer do processo, tal relação não é mantida, podendo estar relacionado com a existência de outros fatores, para além do aumento da temperatura, que são determinantes para acelerar a cinética da reação.

Como referido anteriormente (secção 1.3.2.1.1), o processo de auto-hidrólise, inicia-se com a hidrólise seletiva dos seus grupos acetilo e das ligações glicosídicas presentes nas hemiceluloses, pela ação dos iões H_3O^+ , provenientes da auto-ionização da água e que noutra fase do processo, os iões H_3O^+ provenientes do ácido acético, também atuam como catalisadores, favorecendo a cinética da reação. Assim um dos fatores que pode justificar as variações das constantes de Arrhenius (k) ao longo da severidade do processo, poderá ser o teor em grupos acetilo presente nas hemiceluloses de cada material (Garrote *et al.* 2001).

Assim, poderá ser interessante ver como a energia de ativação e o fator pre-exponencial se relacionam com o teor em grupos acetilo presentes na biomassa. A relação encontrada para a energia de ativação está apresentada na figura seguinte (figura 50), sendo que o perfil para a relação do fator pré-exponencial é semelhante (dados não apresentados).

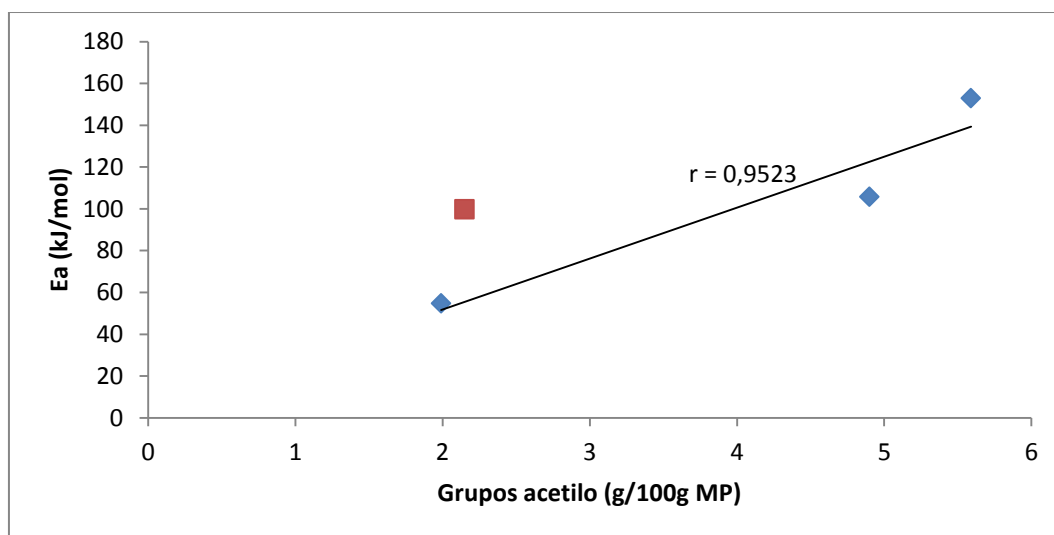


Figura 50 Relação entre a energia de ativação (kJ/mol) e do teor em grupos acetilo (g/100g MP) presentes em cada material (o quadrado vermelho (■) é referente às sementes de anona e foi excluído da análise de regressão)

A energia de ativação é usualmente entendida como uma “barreira energética” que tem de ser ultrapassada para que a reação ocorra. Assim quanto maior for a E_a , mais lenta será a reação. Pelo contrário, quanto maior for o fator pré-exponencial maior será a velocidade da reação.

Como é possível observar, quer a energia de ativação, quer o factor pré-exponencial para a reação de despolimerização das hemiceluloses seguem uma tendência crescente com o aumento do teor em grupos acetilo presentes nos materiais. Note-se que as sementes de anona (representada pelo ponto vermelho na figura) apresentam um comportamento relativamente *outlier* do apresentado para os outros três materiais e foi excluído da análise.

O aumento do valor do fator pré-exponencial com o teor de grupos acetilo seria expectável. Pelo contrário, o aumento da energia de ativação com o teor em grupos acetilo é um pouco contraintuitivo, pois esperar-se-ia uma diminuição da energia de ativação com uma maior presença de grupos acetilo, dada a sua alegada contribuição para a hidrólise. Levanta-se aqui a hipótese de que este efeito seja associado a uma maior dificuldade inicial de despolimerização das hemiceluloses acetiladas. A comparação com a literatura não permite ir mais longe, devido aos factos já apontados acima, pelo que se considera útil a realização de novos estudos com novos materiais sob condições operacionais reprodutíveis que permitam a elucidação deste efeito.

3.4 Avaliação da estabilidade dos licores, durante o armazenamento

De modo a avaliar a estabilidade ao armazenamento dos licores ótimos obtidos a partir de cada material, parte destes licores, foram apenas filtrados e armazenados à temperatura ambiente, em local escuro e seco, não se tendo feito qualquer esterilização do licor para evitar a contaminação microbiana. Este ensaio foi realizado de modo a estudar a viabilidade de armazenamento dos licores à temperatura ambiente, na indústria.

Na figura seguinte (Figura 51) encontram-se representadas as variações de concentrações dos OS (gL^{-1}), presentes nos licores selecionados como ótimos para os diferentes materiais, em função do tempo de armazenamento (semanas) à temperatura ambiente.

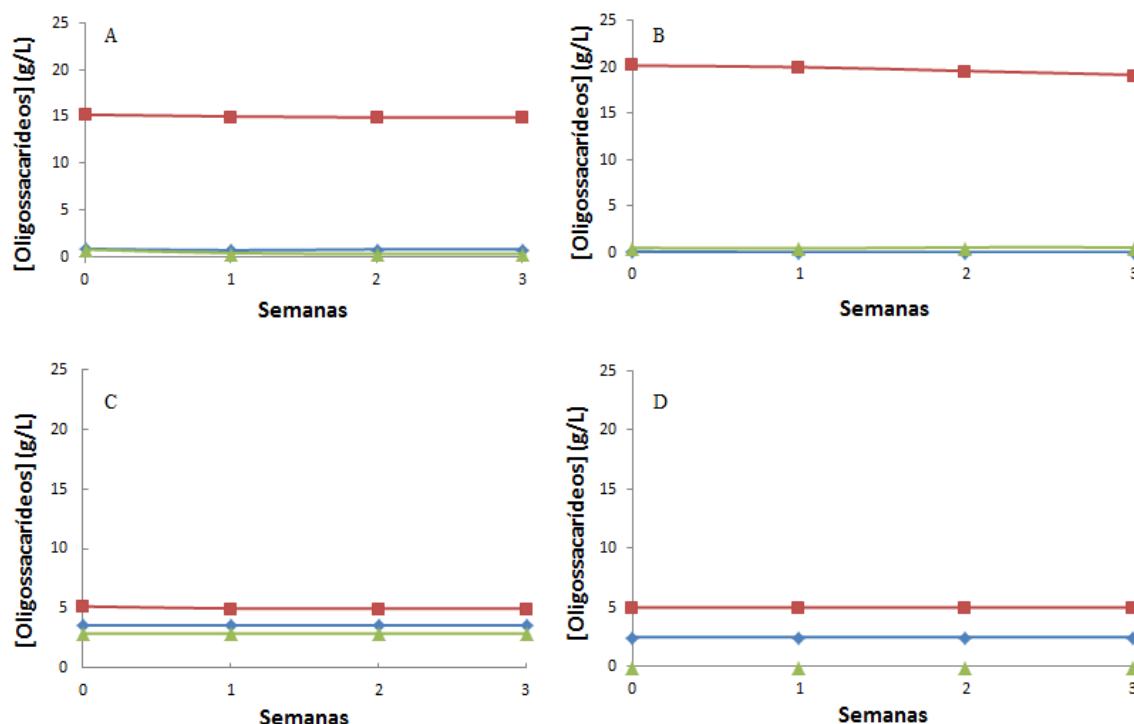


Figura 51 Perfil das concentrações dos oligossacarídeos (♦ GOS, ■ XOS e ▲ AOS), presentes nos licores da casca de pinhão (A), da casca do caroço de pêssago (B), do BAE (C) e das sementes de anona (D), em função do tempo de armazenamento (semanas) à temperatura ambiente

Como é possível observar, durante o este período de armazenamento (3 semanas), todos os OS produzidos, são estáveis ao armazenamento à temperatura ambiente, nas condições de pH presentes no licor.

Na literatura, não se encontra reportado nenhuma avaliação da estabilidade semelhante, pelo que não é possível comparar os dados, no entanto, este resultado corresponde ao inicialmente previsto.

O facto de também não ocorrer contaminação nos licores, pode estar relacionado com a presença de concentrações significativas de furfural e ácido acético, que são descritos na literatura como inibidores do crescimento microbiano (Palmqvist *et al.* 2000, Garrote *et al.* 2001). No entanto, o furfural, embora apareça em muitos alimentos e aromatizantes (Paterson 2009), é irritante para a pele, pode provocar queimaduras graves, para além de ser teratogénico. Assim, alimentos contendo este composto não podem ser processados e ingeridos, havendo a necessidade de efetuar uma purificação prévia dos licores.

3.5 Purificação dos licores

Para purificar os licores e consequentemente os OS presentes, a fim de remover o furfural e o ácido acético, os licores selecionados como ótimos foram submetidos à liofilização. Há outros métodos passíveis de ser utilizados, como a utilização de *spray-dryers*, mas estes usualmente realizados a temperaturas elevadas que podem destruir os OS produzidos. Assim, neste trabalho, optou-se pela utilização da liofilização que é um método mais suave. Na literatura, o método de liofilização, para além de um bom método de concentração, é referido como um bom método de purificação de biomoléculas, cuja estrutura deve ser mantida, como as proteínas (Gatlin *et al.* 1994) e, para além disso, é descrito como uma boa técnica para melhorar a estabilidade a longo prazo de agentes farmacológicos (Abdelwahed *et al.* 2006).

Os resultados apresentados na Figura 52, representam a relação entre as concentrações de furfural e o ácido acético e as concentrações de xilose (uma vez que os XOS foram os OS produzidos em maior quantidade) presentes nos licores ótimos selecionados para cada material, antes e após liofilização.

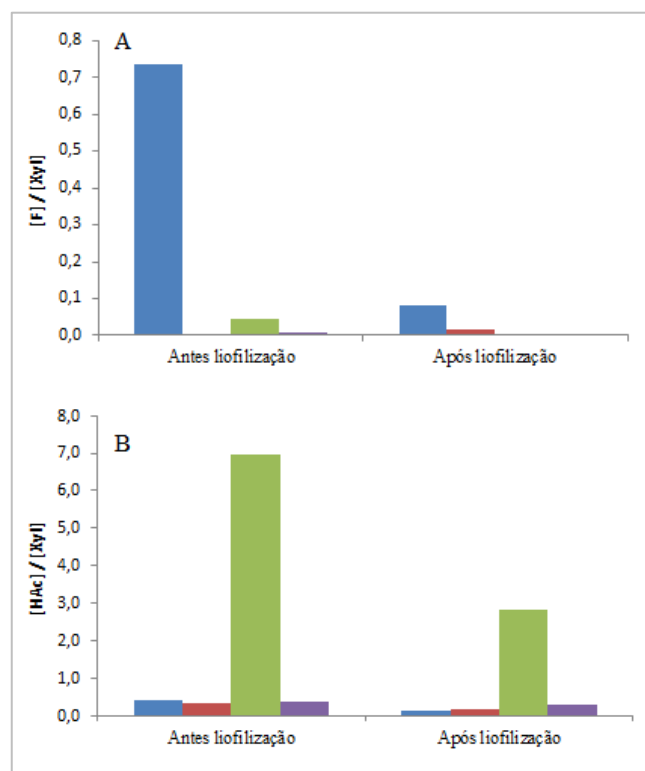


Figura 52 Razão entre a concentração de furfural (A) e ácido acético (B) e a concentração de xilose, presente no licor, produzido nas condições ótimas, para a ■ casca de pinhão, ■ casca de caroço de pêssgo, ■ BAE e ■ sementes de anona, antes e após liofilização

Como é possível observar, foi possível, purificar os licores removendo o furfural, quase totalmente. A liofilização também é um método eficiente de remoção do ácido acético, no entanto, no BAE e nas sementes de anona, apesar de ser conseguido remover cerca de metade do ácido acético presente, ainda se encontra a concentrações elevadas. Assim, pese embora sejam ainda necessários mais estudos sobre a liofilização destes licores, ficou demonstrada a sua utilidade para a remoção de furfural e do ácido acético dos OS presentes nos licores a utilizar na indústria alimentar. A liofilização, também permitiu a remoção de água dos licores, o que pode contribuir para a sua mais fácil armazenagem.

3.6 Avaliação da estabilidade dos OS em função do pH e temperatura

Depois de purificados os OS foram avaliados quanto à sua estabilidade, em função do pH (1, 2, 3, 7 e 11) e da temperatura (37 °C e 100 °C). Esta estabilidade foi avaliada, relacionando a concentração em monossacarídeos maioritários (glucose, xilose e arabinose) antes e após os ensaios de estabilidade.

Na Figura 53 encontra-se representado o perfil de estabilidade dos OS produzidos, em função do pH, a 100 °C, durante uma hora.

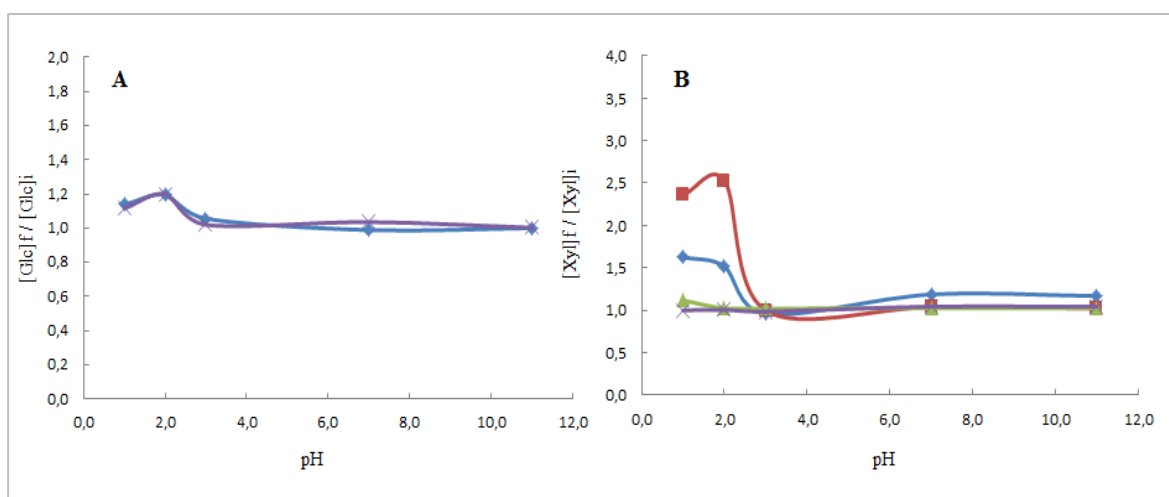


Figura 53 Estabilidade a 100°C dos A) GOS e B) XOS de ■ casca de pinhão, ■ casca de caroço de pêssgo, ■ BAE e ■ sementes de anona, em função do pH

Como é possível observar, todos os OS produzidos (GOS, XOS) são estáveis a valores de pH entre 3 e 11 a 100 °C. Este resultado é muito interessante e compara favoravelmente com a literatura, onde se observou que oligossacáridos não digeríveis provenientes de farelo de trigo e de chicória apresentam uma menor estabilidade a pH 11 e

pH 3 (Courtin *et al.* 2009, Rumpagaporn *et al.* 2012), principalmente os derivados de chicória.

Pela observação da figura 53-B é possível retirar conclusões acerca da estabilidade dos OS produzidos a partir de cada material e, como é observado, os OS da casca de pinhão e das sementes de anona são os mais estáveis a 100 °C, mesmo nas condições de pH mais baixas (pH 1 e 2). Assim a percentagem de OS hidrolisados nas soluções tampão destes materiais ao longo do ensaio de temperatura a 100 °C é nula. No caso da casca de caroço de pêssgo e no BAE tal estabilidade a valores de pH mais baixos não é verificada. Os XOS presentes no BAE a pH 1 e 2 foram hidrolisados cerca de 10% e os XOS presentes na casca de caroço de pêssgo são os mais instáveis, tendo-se atingido valores de cerca de 150% de XOS hidrolisados. Este valor é explicado, pela menor severidade do tratamento a 100 °C das soluções de pH mais baixo (pH 1 e 2) preparadas do que a hidrólise ácida do licor obtido na auto-hidrólise, na presença de ácido sulfúrico diluído a 4%. Na literatura os XOS são descritos como os mais estáveis após tratamento a 100 °C (Courtin *et al.* 2009) e tal facto é confirmado ao verificar a estabilidade dos XOS produzidos a partir das sementes de anona, em relação aos GOS obtidos a partir do mesmo material.

Deste modo, todos OS produzidos a partir dos materiais estudados, podem ser aplicados em alimentos, a gamas de pH entre 3 e 11, podendo ser passíveis de processamento alimentar.

Uma vez que os OS produzidos podem ser processados no ramo alimentar, surge a necessidade de caracterizar estabilidade destes OS durante a digestão dos alimentos no estômago. Deste modo simularam-se as condições de digestão experimentalmente, ou seja, em soluções de pH 1 e 2 (pH do estômago) (Hong *et al.* 2005), durante 3h a 37 °C (temperatura corporal) e os perfis de estabilidade obtidos estão representados na Figura 54.

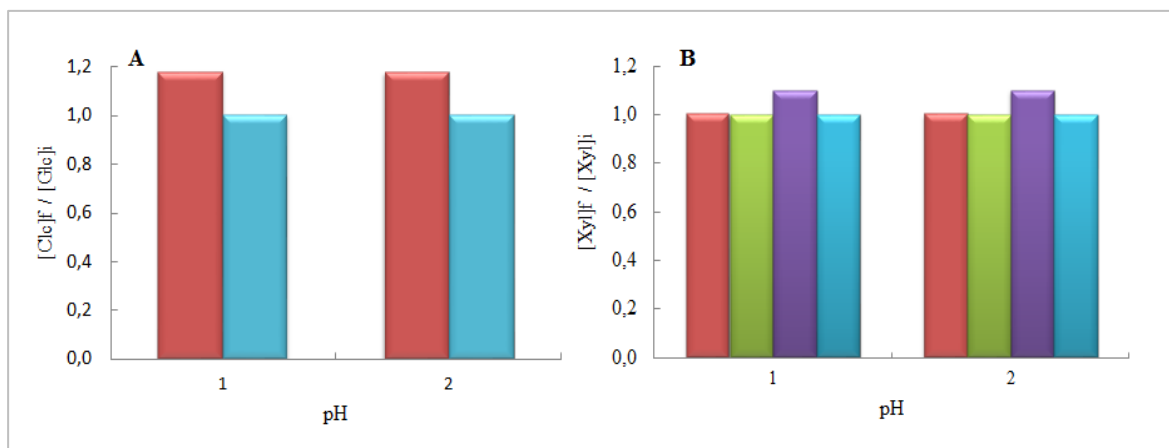


Figura 54 Estabilidade a 37°C dos A) GOS e B) XOS de ■ casca de pinhão, ■ casca de caroço de pêssago, ■ BAE e ■ sementes de anona, em função do pH

Como é possível verificar, todos os OS produzidos, são estáveis às condições de digestão simuladas, tal como era esperado, pois na literatura (Wang *et al.* 2000, Rumpagaporn *et al.* 2012) é descrita a estabilidade de OS a 25, 37 e 50 °C a pH 1 e 2.

Deste modo, é possível afirmar que os OS produzidos e purificados, apresentam uma estabilidade considerável a diferentes condições de pH e temperatura poderão ter uma aplicabilidade na indústria alimentar. Mais, sendo provenientes de quatro materiais de composição química muito diversificada, podem potencialmente ter propriedades diferentes nomeadamente ao nível das atividades biológicas, que urge explorar em trabalhos subsequentes.

3.7 Caracterização da digestibilidade enzimática dos resíduos sólidos obtidos

De modo a melhor perspetivar a da valorização dos materiais num enquadramento de biorrefinaria, torna-se necessário encontrar uma aplicação para a biomassa remanescente após o tratamento de auto-hidrólise. Neste sentido, torna-se necessário caracterizar a sua digestibilidade enzimática com vista à valorização da celulose aí presente. Para tal, foram realizados ensaios enzimáticos utilizando as enzimas *Celluclast* 1.5L e *Novozyme* 188.

No Quadro 15 encontram-se apresentadas as concentrações de glucose (gL^{-1}) e os respetivos rendimentos (%), obtidos após hidrólise enzimática, das frações granulométricas selecionadas para cada material, sem qualquer tratamento.

Quadro 15 Concentração em glucose (g/L) e rendimento em glucana (%) obtidos nos ensaios enzimáticos dos materiais não tratados

| Material | [Glc] (g/L) | Rendimento em |
|----------|------------------------|---------------|
|----------|------------------------|---------------|

| | | glucose (%) |
|----------------------------|------|-------------|
| Casca de pinhão | 0,00 | 0,00 |
| Casca de caroço de pêssego | 0,00 | 0,00 |
| BAE | 0,66 | 18,94 |
| Sementes de anona | 1,33 | 35,78 |

Pela interpretação do quadro 15 é possível verificar a digestibilidade enzimática apreciável da fração de sementes de anona selecionada para o processamento hidrotérmico.

Nas figuras seguintes, encontram-se apresentadas as concentrações em glucose (Figura 55) e os respectivos rendimentos em glucose relativos à condição de severidade menor (Figura 56) pra todos os resíduos sólidos obtidos para cada material, após auto-hidrólise, em função do $\text{Log } R_0$.

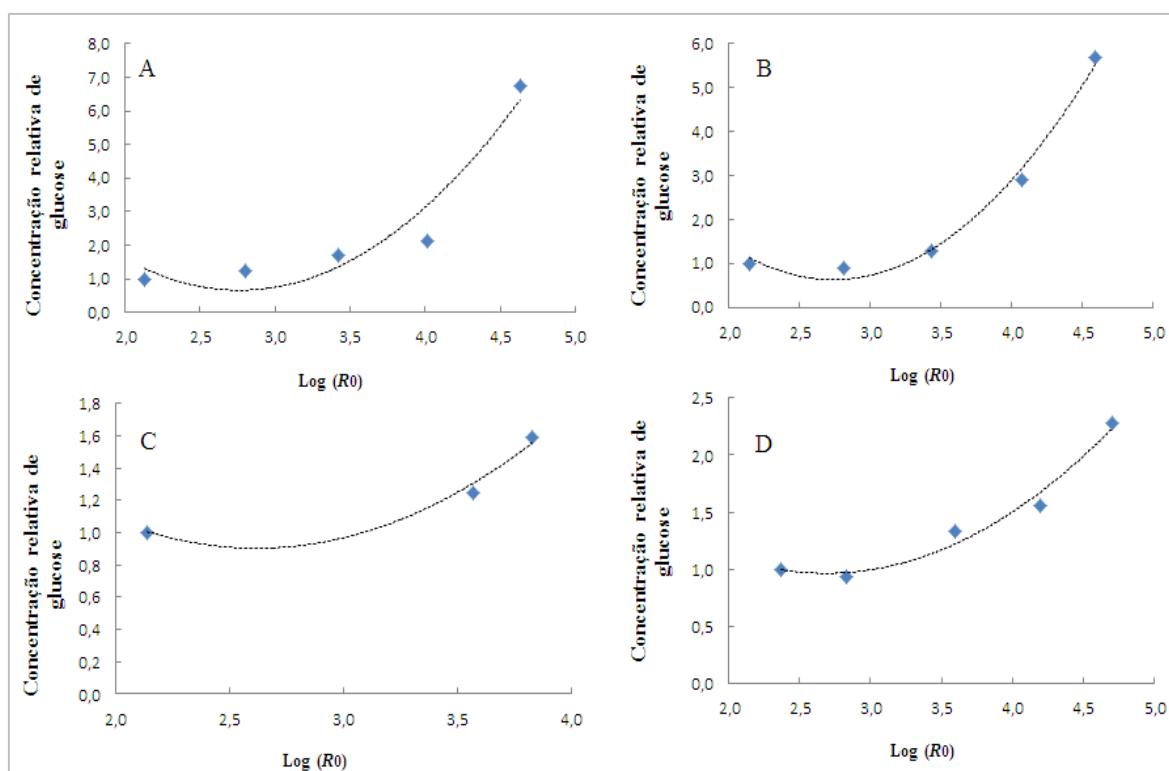


Figura 55 Concentração relativa de glucose obtida nos ensaios de hidrólise enzimática de (A) casca de pinhão, (B) casca de caroço de pêssego, (C) BAE e (D) sementes de anona, em função do $\text{Log } R_0$

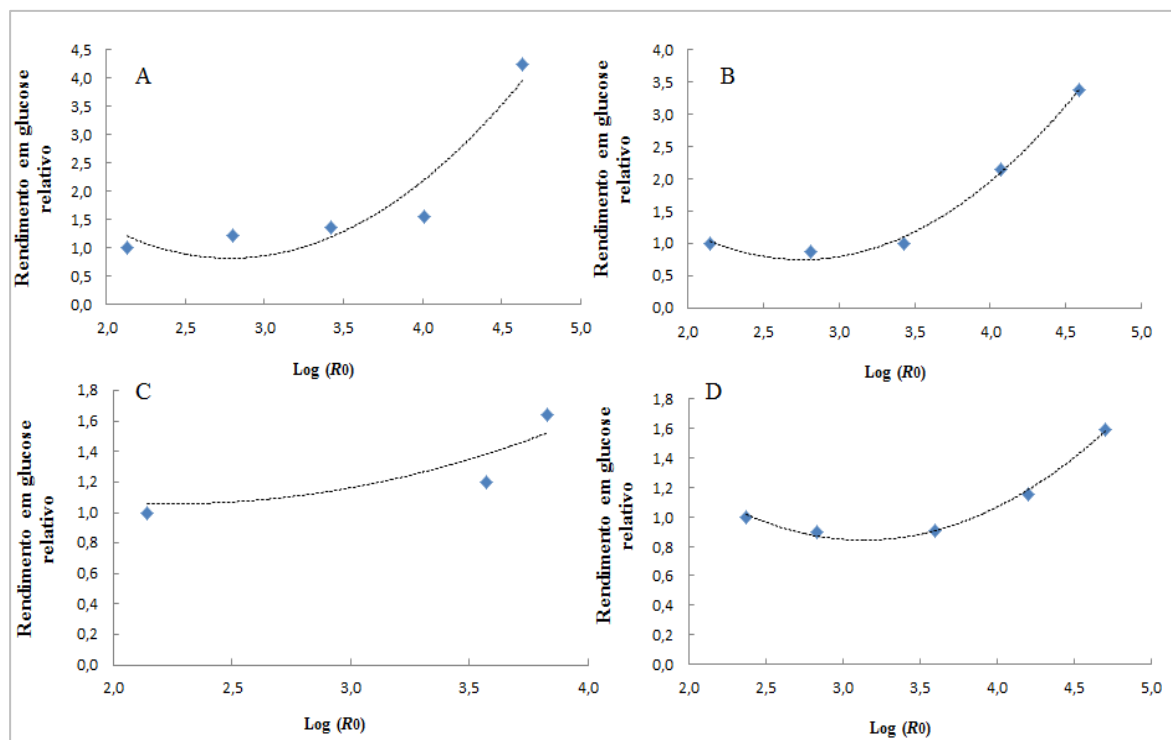


Figura 56 Rendimento em glucose relativo obtido nos ensaios de hidrólise enzimática de (A) casca de pinhão, (B) casca de caroço de pêssego, (C) BAE e (D) sementes de anona, em função do $\text{Log } R_0$

Pelas figuras 55 e 56 é possível observar uma tendência para um aumento exponencial da digestibilidade em função da severidade do tratamento para todos os materiais estudados. Foram atingidas concentrações máximas em glucose de $1,31 \text{ gL}^{-1}$ na casca de pinhão, de $1,27 \text{ gL}^{-1}$ na casca de caroço de pêssego, de $1,35 \text{ gL}^{-1}$ para o BAE e de $4,77 \text{ gL}^{-1}$ para as sementes de anona.

Contudo, embora se tenha observado este aumento de digestibilidade, ainda assim, foram obtidos rendimentos baixos em glucose para todos os materiais.

Na casca de pinhão foram atingidos rendimentos máximos de 17%, enquanto na casca de caroço de pêssego e de BAE os rendimentos atingiram valores de 20% e 34 %, respetivamente. Nas sementes de anona foram obtidos rendimentos de 83 %. Deste modo, persiste ainda a necessidade de determinar outros fatores que influenciem a digestibilidade enzimática, para que se consigam rendimentos interessantes a nível industrial. De facto comparando com a literatura para o BAE, são descritos valores de rendimento em glucose de 83%. No entanto, o processamento por auto-hidrólise foi realizado em condições não-isotérmicas (Fernandes *et al.* 2012). Não são conhecidos estudos para os restantes materiais.

É de realçar que a quantidade de enzimas por quantidade de glucanas presentes nos resíduos sólidos obtidos, ao longo das severidades testadas, diminui com o aumento da severidade (Yang *et al.* 2006), uma vez que os materiais pré-tratados têm cada vez maior percentagem relativa de glucose. Este facto é indicador de que o processamento dos resíduos sólidos a condições mais severas torna a superfície das partículas mais acessível (Yang and Wyman 2006, Fernandes *et al.* 2012) e as figuras anteriores expressam claramente esta tendência.

Sendo a solubilização das hemiceluloses ao longo do processamento hidrotérmico o principal efeito observado sobre os resíduos obtidos (Fernandes *et al.* 2012), foi traçado um perfil que relaciona a o rendimento em glucose atingido após hidrólise enzimática com a remoção de hemiceluloses, durante a auto-hidrólise, ao longo das condições de severidade testadas, para cada material (Figura 57).

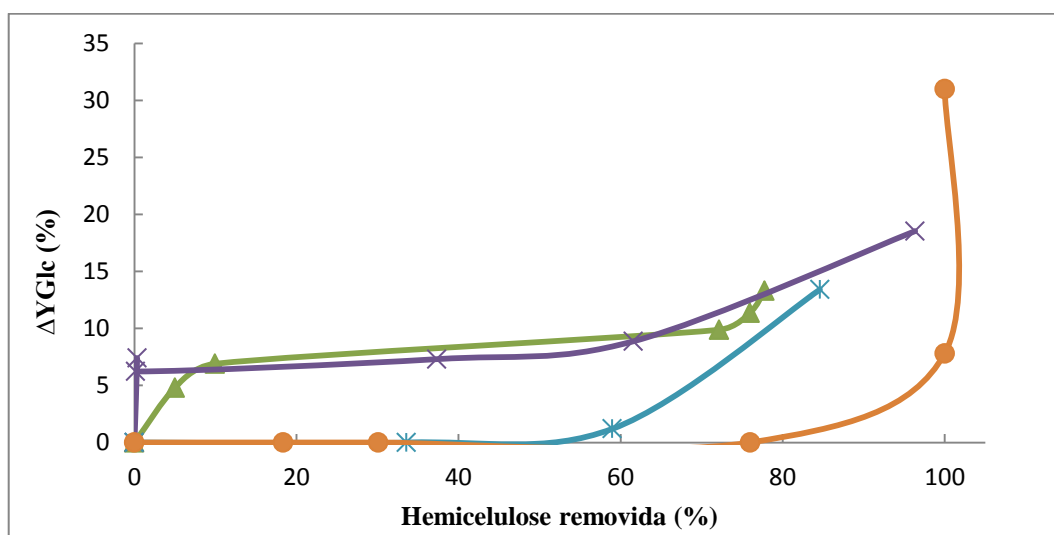


Figura 57 Relação entre o rendimento em glucose (%) obtido após hidrólise enzimática em função da quantidade de hemicelulose removida durante o processo de auto-hidrólise da ■ casca de pinhão, ■ casca de caroço de pêssgo, ■ BAE e das ■ sementes de anona

Era de esperar uma relação mais clara entre o aumento da digestibilidade e a remoção de hemiceluloses, como já observado para alguns materiais, no entanto, pela interpretação da figura 57, é possível verificar que, só no caso da casca de caroço de pêssgo e do BAE é que esta relação existe e só em condições em que ocorre uma remoção de hemiceluloses superior a 60%.

Deste modo, é possível concluir que não é apenas a remoção de hemiceluloses durante a auto-hidrólise que influencia a digestibilidade, tornando-se assim necessário

estudar outros fatores que possam ser correlacionados com o aumento exponencial da digestibilidade enzimática, principalmente para o caso das sementes de anona. Por exemplo, a redução da granulometria do material por cominuição, embora altamente desfavorável do ponto de vista de consumo energético, aumenta a área superficial disponível nos resíduos sólido e diminui o DP da celulose, favorecendo a digestibilidade enzimática (Rivers *et al.* 1987).

Do ponto de vista tecnológico, o aumento da quantidade de açúcares contidos na fração celulósica (glucose), e a consequente aumento da sua recuperação por hidrólise enzimática, representam uma mais-valia e abrem a possibilidade de estes materiais pré-tratados serem utilizados como substrato para a produção de etanol por via fermentativa.

4 Conclusões e perspectivas

As sementes são subprodutos comuns entre os provenientes do processamento industrial de frutos. Atualmente, não existe para a sua maioria, quaisquer processos de valorização para além da sua queima para recuperação de energia. De entre estas as sementes de pinheiro manso (cascas), caroço de pêsego, de sementes anona e de azeitona (na sua forma de bagaço de azeitona extratado) são exemplo típicos desta problemática. Dada a sua natureza lenhocelulósica, estes materiais apresentam potenciais vantagens para serem utilizados nas biorrefinarias. Este trabalho evidencia esse elevado potencial, tendo-se conseguido definir uma estratégia integrada de valorização.

Todos os materiais apresentam uma composição rica em polissacarídeos, sendo que as hemiceluloses correspondem a cerca de 50%, do total de polissacarídeos. Claramente, este facto, revela a importância de estudar processos específicos e integrados que permitam a valorização das hemiceluloses, e este foi um dos principais objetivos deste trabalho.

A auto-hidrólise confirmou ser um método de fracionamento altamente seletivo para a recuperação das hemiceluloses, tendo-se observado uma correlação muito significativa entre a recuperação de matéria solúvel e a percentagem de hemicelulose dos materiais. Além disso, este processo apenas utiliza água como agente reacional e em baixas quantidades (as razões líquido-sólido utilizadas encontram-se entre as mais baixas descritas na literatura), contribuindo assim para economia geral do processo.

Como era esperado, os principais produtos resultantes deste processo foram os oligossacarídeos, produtos de elevado potencial económico cuja produção urge otimizar, sendo este o outro dos principais objetivos deste trabalho.

De modo a comparar mais facilmente condições operacionais e o seu efeito nos diferentes materiais, optou-se pela utilização do fator de severidade ($\text{Log } R_0$). Dependendo dos materiais, a produção máxima de oligossacarídeos ocorreu em condições diferentes de severidade que variaram entre aproximadamente 3,6 para o BAE e anona e superiores a 4, para a casca de pinhão e do caroço de pêsego.

A casca de caroço de pêsego demonstrou ser a principal potencial fonte de OS, que são xilo-oligossacarídeos substituídos com grupos acetilo, tendo-se obtido cerca de 20,15 gL⁻¹. A partir do BAE foi possível obter arabinoglucoxilo-oligossacarídeos, com concentrações máximas de 12 gL⁻¹ e a partir de sementes de anona obtiveram-se gluco-

oligossacarídeos ($2,41 \text{ gL}^{-1}$, provenientes de glucanas facilmente hidrolisáveis, provavelmente amido, a confirmar posteriormente) e de xilo-oligossacarídeos ($4,46 \text{ gL}^{-1}$). A partir de pinhão obtiveram-se OS ricos em galactose e manose, para além de xilose, com concentrações máximas de $14,88 \text{ gL}^{-1}$.

Em termos de rendimento, o melhor foi encontrado para a casca do pinhão (25 g/100g Xn), seguida da casca de caroço de pêssago (20 g/100g Xn).

Com este trabalho, foi ainda possível observar uma relação entre a extensão da hidrólise e os perfis de pressão obtidos para os diferentes materiais. Como se sabe, a partir da equação de Antoine, a pressão tende a subir exponencialmente com a temperatura, no entanto, foram observadas diferenças de pressão, entre os ensaios de auto-hidrólise e ensaios com água. Este facto foi correlacionado com a concentração de produtos da reação, nomeadamente de produtos voláteis totais (ácidos alifáticos e compostos furânicos) e permite fazer antever uma forma de controlo *on-line* do processo a nível industrial.

A modelização matemática do processo permitiu ainda a identificação do teor de grupos acetilo como um dos principais fatores que condicionam a cinética do processo de auto-hidrólise e este caminho deve ser explorado procurando aplicar estes modelos a dados obtidos para outros materiais em condições operacionais semelhantes que permitam a mais fácil comparação dos dados.

Os licores obtidos na condição ótima, bem como, os OS presentes nestes licores foram caracterizados quanto à sua estabilidade ao armazenamento à temperatura ambiente. Os OS obtidos são todos igualmente estáveis à temperatura e contaminação microbiana, que se pensa estar relacionada com a presença de furfural e ácido acético nos licores. Uma vez que, estes compostos não podem estar presentes nos alimentos para consumo humano, surge a necessidade de uma purificação prévia. Com este trabalho, também foi possível confirmar, o método de liofilização, como um bom processo de purificação, pois foi possível remover quase na totalidade o furfural e o ácido acético.

Após remoção destes dois compostos prejudiciais à saúde quando inseridos nos alimentos, foi também estudada, a estabilidade dos oligossacarídeos ao pH e à temperatura. Os OS presentes na casca de pinhão demonstraram ser os mais estáveis a 100°C , independentemente das condições de pH aplicadas. A estabilidade de todos os OS

produzidos, a partir de cada material estudado, também foi confirmada a valores de pH entre 3 e 11. Deste modo, os OS produzidos e previamente purificados, podem ser aplicados na indústria alimentar, a gamas de pH entre 3 e 11, podendo ser passíveis de processamento alimentar.

Os OS produzidos, uma vez provenientes de quatro sementes de composição distinta, têm potencialmente propriedades distintas, podendo ser utilizados nas mais variadas aplicações, nomeadamente na indústria alimentar. Deste modo, foi necessário determinar a estabilidade dos OS, durante a sua digestão no estômago, os quais, demonstraram ser estáveis a 37°C, durante um período de 3 horas e a valores de pH entre 1 e 2.

Para além das hemiceluloses, são de grande importância, as quantidades de lenhina e de celulose (avaliada como glucana) presente em todos os materiais e, no caso da anona, também a quantidade de proteínas. A celulose e a lenhina, são recuperadas quase totalmente na fase sólida, permitindo processamentos posteriores para a recuperação de compostos de elevado valor, nomeadamente de compostos fenólicos. Para a celulose, os estudos realizados também permitiram demonstrar o efeito positivo que a extensão do processo de auto-hidrólise tem, sobre o aumento da digestibilidade enzimática, tendo-se observado um aumento tendencialmente exponencial da digestibilidade aplicado para todos os materiais estudados, ao longo da severidade do processo. Embora se tenha observado este aumento de digestibilidade, pela ação das enzimas *Celluclast* 1.5L e *Novozyme* 188, ainda assim, foram obtidos rendimentos baixos em glucose para todos os materiais, à exceção das sementes de anona. Não foi possível encontrar uma relação inequívoca entre a solubilização das hemiceluloses ao longo do processamento hidrotérmico e este aumento, pelo que ainda há a necessidade de determinar quais os outros fatores relevantes, para que se consigam rendimentos interessantes a nível industrial.

Apesar dos resultados obtidos, são ainda necessários mais trabalhos para que a valorização das sementes estudadas possam ser uma realidade. Antes de mais, torna-se relevante fazer um estudo da economia do processo (por exemplo utilizando o Aspen plus) por forma a focar estudos posteriores não só nos materiais que apresentem maior potencial, mas também para identificar quais os processos que necessitam de maior otimização.

A realização de mais ensaios sob diferentes condições experimentais também são necessárias, de maneira a verificar que os incrementos de pressão obtidos no sistema estão correlacionados com a pressão parcial de cada composto volátil e a sua composição nos licores. Outra perspectiva futura reside na avaliação de que maneira o arrefecimento do reator afeta a composição dos licores em OS, bem como de outros compostos.

Surgiram ainda questões que necessitam de mais estudos para o seu esclarecimento, como qual o impacto da dimensão das partículas na hidrólise enzimática, bem como, a determinação dos fatores limitantes à hidrólise enzimática dos materiais.

Outra necessidade está em recorrer a outros métodos de purificação dos OS, a fim de avaliar o mais eficaz, para poder ser rentável à biorrefinaria, em termos de custos energéticos e de tempo de operação.

A análise do conteúdo dos licores por HPLC revelou-se eficaz, mas insuficiente. Assim, é também imperativo o recurso a técnicas hifenadas (HPLC-MS e GC-MS), devido à incerteza na quantificação de monossacarídeos e ácidos alifáticos, bem como, à necessidade de precisar a composição de compostos fenólicos. Esta análise será proveitosa do ponto de vista estratégico (ao avaliar a adaptação da purificação de compostos fenólicos nativos), mas principalmente do ponto de vista da modelação dos resultados, crucial para o *scale-up* do processo.

Futuramente, também devem ser realizados estudos, a fim de avaliar os OS produzidos por auto-hidrólise, se podem considerar potencialmente atrativos como novos compostos prébióticos, capazes de estimular seletivamente o crescimento de algumas bactérias consideradas benéficas para a flora intestinal.

Após uma quantificação mais precisa dos licores resultantes do processamento hidrotérmico das sementes estudadas, será possível propor um modelo matemático mais completo, ao incluir a despolimerização das hemiceluloses, em ácidos alifáticos e monossacarídeos, bem como, nos seus produtos de degradação. De maneira a melhorar a previsão dos resultados experimentais, a integração deste modelo terá obrigatoriamente que passar por métodos numéricos mais robustos. Este modelo será determinante para a definição das condições operacionais a empregar no novo reator piloto concebido pela UCASUL (Figura 58), e para um *scale-up* adequado do processo de auto-hidrólise dos materiais estudados neste trabalho.



Figura 58 Reator piloto para auto-hidrólise disponível no LNEG

5 Referências bibliográficas

- Abad, S., Alonso, J. L., Santos, V. and Parajó, J. C. (1997). "Furfural from wood in catalyzed acetic acid media: A mathematical assessment." Bioresource Technology **62**: 115-122.
- Abdelwahed, W., Degobert, G., Stainmesse, S. and Fessi, H. (2006). "Freeze-drying of nanoparticles: Formulation, process and storage considerations." Advanced Drug Delivery Reviews **58**: 1688-1713.
- Adney, B. and Baker, J. (2008). "Measurement of cellulase activities". Inovation for our energy future, National Renewable Energy Laboratory (NREL), Golden, Colorado, USA.
- Aguilar, R., Ramírez, J. A., Garrote, G. and Vázquez, M. (2002). "Kinetic study of the acid hydrolysis of sugar cane bagasse." Journal of Food Engineering **55**: 309-318.
- Alburquerque, J. A., González, J., García, D. and Cegarra, J. (2004). "Agrochemical characterisation of 'Alperujo', a solid by-product of the two-phase centrifugation method for olive oil extraction." Bioresource Technology **91**: 195-200.
- Alén, R. (2000). "Structure and chemical composition of wood", *em* Forest products chemistry. New York, USA, Stenius, P.: 11-57.
- Almeida, J. R. M., Modig, T., Petersson, A., Hahn-Hägerdal, B., Lidén, G. and Gorwa-Grauslund, M. F. (2007). "Increased tolerance and conversion of inhibitors in lignocellulosic hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*." Journal of Chemical Technology & Biotechnology **82**: 340-349.
- AOAC (2000). "Official methods of analysis: Agricultural chemicals, contaminants and drugs". Washington D.C., USA, Association of Official Analytical Chemists.
- Arvanitoyannis, I. S., Kassaveti, A. and Stefanatos, S. (2007). "Olive oil waste treatment: a comparative and critical presentation of methods, advantages & disadvantages." Critical Reviews in Food Science and Nutrition **47**: 187-229.
- Ballesteros, I., Oliva, J. M., Negro, M. J., Manzanares, P. and Ballesteros, M. (2002). "Simultaneous saccharification and fermentation process for converting the cellulosic fraction of olive oil extraction residue into ethanol." Grasas y Aceites **53**: 282-288.
- Barreteau, H., Delattre, C. and Michaud, P. (2006). "Production of oligosaccharides as promising new food additive generation." Food Technology and Biotechnology **44**: 323-333.
- Berghem, L. E. R. and Pettersson, L. G. (1974). "Mechanism of enzymatic cellulose degradation: Isolation and some properties of a beta-glucosidase from *Trichoderma viride*." European Journal of Biochemistry **46**: 295-305.
- Bernardo, P. (2011). "Optimização de pré-tratamentos hidrotérmicos para a hidrólise selectiva das hemiceluloses de bagaço de azeitona extractado". Tese de Mestrado em Engenharia Química e Bioquímica, Universidade Nova de Lisboa.

Branco, P. C., Castilho, P. C., Rosa, M. F. and Ferreira, J. (2010). "Characterization of *Annona cherimola* Mill. seed oil from Madeira Island: a possible biodiesel feedstock." Journal of the American Oil Chemists' Society **87**: 429-436.

Branco, P. C., Torrado, I., Roseiro, L., Rodrigues, I., Silva, T. L., Carvalheiro, F., Castilho, P. and Duarte, L. C. (2010). "Annona (*Annona cherimola* Mill.) seeds: A novel biorefinery feedstock?". Fourth annual workshop of COST "Biotechnical Processing of Lignocellulosic Raw Materials". Cesme, Izmir, Turkey.

Browning, B. L. (1967). Browning 1967. New York, USA, John Wiley & Sons.

Caparrós, S., Garrote, G., Ariza, J., Diaz, M. J. and Lopez, F. (2007). "Xylooligosaccharides production from *Arundo donax*." Journal of Agricultural and Food Chemistry **55**: 5536-5543.

Caputo, A. C., Scacchia, F. and Pelagagge, P. M. (2003). "Disposal of by-products in olive oil industry: Waste-to-energy solutions." Applied Thermal Engineering **23**: 197-214.

Cardoso, S., Guyot, S., Marnet, N., Lopes-da-Silva, J., Silva, A., Renard, C. M. G. C. and Coimbra, M. A. (2006). "Identification of oleuropein oligomers in olive pulp and pomace." Journal of the Science of Food and Agriculture **86**: 1495-1502.

Carrasco, F. (1989). "Fundamentos del fraccionamiento de la biomassa." Afinidad **46**: 425-429.

Carvalheiro, F., Duarte, L. C. and Gírio, F. M. (2008). "Hemicellulose biorefineries: a review on biomass pretreatments." Journal of Scientific & Industrial Research **67**: 849-864.

Carvalheiro, F., Esteves, M. P., Parajó, J. C., Pereira, H. and Gírio, F. M. (2004). "Production of oligosaccharides by autohydrolysis of brewery's spent grain." Bioresource Technology **91**: 93-100.

Carvalheiro, F., Garrote, G., Parajó, J. C., Pereira, H. and Gírio, F. M. (2005). "Kinetic modeling of brewery's spent grain autohydrolysis." Biotechnology Progress **21**: 233-243.

Carvalheiro, F., Silva-Fernandes, T., Duarte, L. C. and Gírio, F. M. (2009). "Wheat straw autohydrolysis: Process optimization and products characterization." Applied Biochemistry and Biotechnology **153**: 84-93.

Clark, W. M. and Lubs, H. A. (1917). "Preparation of buffers", *em* Determination of pH. New York, USA, John Wiley & Sons: 409-415.

Coimbra, M., Cardoso, S. and Lopes-da-Silva, J. A. (2010). "Olive pomace, a source for valuable arabinan-rich pectic polysaccharides." Topics in Current Chemistry **294**: 129-141.

Conner, A. H. (1984). "Kinetic modeling of hardwood prehydrolysis. Part I. Xylan removal by water prehydrolysis." Wood and Fiber Science **16**: 268-277.

Costa, R. and Evaristo, I. (2008). "Condução de povoamentos de Pinheiro Manso e características nutricionais do pinhão". Relatório final do projeto AGRO 945, Instituto Nacional dos Recursos Biológicos.

Courtin, C. M., Swennen, K., Verjans, P. and Delcour, J. A. (2009). "Heat and pH stability of prebiotic arabinoxylooligosaccharides, xylooligosaccharides and fructooligosaccharides." Food Chemistry **112**: 831-837.

Crittenden, R. G. and Playne, M. J. (1996). "Production, properties and applications of food-grade oligosaccharides." Trends in Food Science & Technology **7**: 353-361.

Dekker, R. F. H. and Wallis, A. F. A. (1983). "Enzymic saccharification of sugarcane bagasse pretreated by autohydrolysis steam explosion." Biotechnology and Bioengineering **25**: 3027-3048.

E-Toon (2001a). "Análise do sector olivícola nacional". Rede de Informação sobre Resíduos da Indústria Olivícola. Electronical Technical Transfer Olive Oil Network (e - TOON), Catalunha, Espanha.

E-Toon (2001b). "Métodos de extracção de azeite". Rede de Informação sobre Resíduos da Indústria Olivícola. Electronical Technical Transfer Olive Oil Network (e-TOON), Catalunha, Espanha.

E-Toon (2001c). "Catálogo de tecnologias de energia". Rede de Informação sobre Resíduos da Indústria Olivícola. Electronical Technical Transfer Olive Oil Network (e-TOON), Catalunha, Espanha.

Ebringerová, A., Hromadkova, Z. and Heinze, T. (2005). "Hemicellulose." Advances in Polymer Science **186**: 1-67.

FAOSTAT (2010). www.faostat.fao.org, Data de acesso: 10/12/2012.

Fengel, D. and Wegener, G. (1983). Wood: Chemistry, ultrastructure, reactions. Berlin, Germany, Walter de Gruyter & Co.

Fernandes, M. C., Brás, T. S., Lourenço, P. M. L., Duarte, L. C., Carvalheiro, F., Bernardo, P., Marques, S. and Neves, L. A. (2012). "The effect of autohydrolysis pretreatment on the production of second generation bioethanol from extracted olive pomace". Fourth International conference on engineering for waste and biomass valorisation, Porto, Portugal.

Fernández-Bolaños, J., Felizón, B., Brenes, M., Guillén, R. and Heredia, A. (1998). "Hydroxytyrosol and tyrosol as the main compounds found in the phenolic fraction of steam-exploded olive stones." Journal of the American Oil Chemists' Society **75**: 1643-1649.

Fernández-Bolaños, J., Rodríguez, G., Rodríguez, R., Heredia, A., Guillen, R. and Jiménez, A. (2002). "Production in large quantities of highly purified hydroxytyrosol from liquid-solid waste of two-phase olive oil processing of 'Alperujo'." Journal of Agricultural and Food Chemistry **50**: 6804-6811.

Fiechter, A. (1983). Pentoses and lignin: Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology. Berlin, Germany, Springer-Verlag.

Garrote, G., Domínguez, H. and Parajó, J. C. (1999a). "Hydrothermal processing of lignocellulosic materials." Holz Als Roh-und Werkstoff **57**: 191-202.

Garrote, G., Domínguez, H. and Parajó, J. C. (1999b). "Mild autohydrolysis: an environmentally friendly technology for xylooligosaccharide production from wood." Journal of Chemical Technology and Biotechnology **74**: 1101-1109.

Garrote, G., Domínguez, H. and Parajó, J. C. (2001). "Manufacture of xylose-based fermentation media from corncobs by posthydrolysis of autohydrolysis liquors." Applied Biochemistry and Biotechnology **95**: 195-207.

Garrote, G., Domínguez, H. and Parajó, J. C. (2001). "Study on the deacetylation of hemicelluloses during the hydrothermal processing of *Eucalyptus* wood." Holz Als Roh-und Werkstoff **59**: 53-59.

Garrote, G. and Parajó, J. C. (2002). "Non-isothermal autohydrolysis of *Eucalyptus* wood." Wood Science and Technology **36**: 111-123.

Gatlin, L. A. and Nail, S. L. (1994). "Protein purification process engineering. Freeze drying: A practical overview." Bioprocess Technology **18**: 317-367.

Georgieva, T. I. and Ahring, B. K. (2007). "Potential of agroindustrial waste from olive oil industry for fuel ethanol production." Journal of Biotechnology **2**: 1547-1555.

Ghose, T. K. (1987). "Measurement of cellulase activities." Pure and Applied Chemistry **59**: 257-268.

Giese, E., Hiroshi, T., Silva, M., Silva, R. and Barbosa, A. (2011). Produção, propriedades e aplicações de oligossacarídeos. Semina: Ciências Agrárias. **32**: 683-700.

Gírio, F. M., Carvalheiro, F., Duarte, L. C. and Bogel-Lukasik, R. (2012). "Deconstruction of the hemicellulose: Fraction from Lignocellulosic Materials into simple sugars", *em* D-Xylitol. Berlin, Germany, Springer-Verlag: 3-37.

Gírio, F. M., Fonseca, C., Carvalheiro, F., Duarte, L. C., Marques, S. and Bogel-Lukasik, R. (2010). "Hemicelluloses for fuel ethanol: A review." Bioresource Technology **101**: 4775-4800.

Goldstein, I. S. (1991). "Overview of chemical composition of wood", *em* Wood structure and composition. New York, USA, Menachem L. and Irving. S: 1-6.

Grohmann, K., Torget, R. and Himmel, M. (1985). "Optimization of dilute acid pretreatment of biomass." Biotechnology & Bioengineering Symposium **12**: 59-80.

Hong, W., Jiao, W., Hu, J., Zhang, J., Liu, C. B., Fu, X., Shen, D., Xia, B. and Chang, Z. (2005). "Periplasmic protein HdeA exhibits chaperone-like activity exclusively within stomach pH range by transforming into disordered conformation." Journal of Biological Chemistry **280**: 27029-27034.

IUPAC-IUB (1982). "Abbreviated terminology of oligosaccharide chains." Pure & Applied Chemistry **54**: 1517-1522.

John, M., Schmidt, J., Wandrey, C. and Sahn, H. (1982). "Gel chromatography of oligosaccharides up to dp 60." Journal of Chromatography A **247**: 281-288.

Joswig, M. (2005). "Euler integration and Euler multiplication", *em Advances in geometry*. Berlin, Germany, Grundhöfer, T. and Strambach, K. : 145-169.

Kim, J. S., Lee, Y. Y. and Torget, R. W. (2001). "Cellulose hydrolysis under extremely low sulfuric acid and high-temperature conditions." Applied Biochemistry and Biotechnology **91**: 331-340.

Koizumi, K., Utamura, T. and Okada, Y. (1985). "Analyses of homogeneous *D*-gluco-oligosaccharides and polysaccharides (degree of polymerization up to about 35) by high-performance liquid chromatography and thin-layer chromatography." Journal of Chromatography A **321**: 145-157.

Laine, C. (2005). Structures of hemicelluloses and pectins in wood and pulp. Dissertation for the degree of Doctor of Science in Technology, Finland, Helsinki University of Technology.

Lee, J. (1997). "Biological conversion of lignocellulosic biomass to ethanol." Journal of Biotechnology **56**: 1-24.

Lesage-Meessen, L., Navarro, D., Maunier, S., Sigoillot, J. C., Lorquin, J., Delattre, M., Simon, J. L., Asther, M. and Labat, M. (2001). "Simple phenolic content in olive oil residues as a function of extraction systems." Food Chemistry **75**: 501-507.

Liu, R. and Xu, B. (2011). "Characterization os essential oils in pine nut shells from commodity waste in China by steam distillation and GC-MS." Food Analytical Methods **5**: 435-440.

Lora, J. H. and Glasser, W. G. (2002). "Recent industrial applications of lignin: a sustainable alternative to nonrenewable materials." Journal of Polymers and Environment **10**: 39-48.

Masghouni, M. and Hassairi, M. (2000). "Energy applications of olive-oil industry by-products." Biomass Bioenergy **18**: 257-262.

McIlvaina, T. C. (1921). "A buffer solution for colorimetric comparison." Journal of Biological Chemistry **49**: 183-186.

Miller, G. L. (1959). "Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar." Analytical Chemistry **31**: 426-428.

Mohammad, J. T. and Karimi, K. (2008). "Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: A review." International Journal of Molecular Sciences **9**: 1621-1651.

Moniz, P., Gírio, F. M., Pereira, H. and Carvalheiro, F. (2009). "Hydrothermal processing of corn residues: process optimisation and products characterisation". Proceedings of the conference of 2nd Wood Nordic Biorefinery Helsínquia, Finlândia.

Moniz, P., Pereira, H., Quilhó, T. and Carvalheiro, F. (2013). "Characterisation and hydrothermal processing of corn straw towards the selective fractionation of hemicelluloses." Industrial Crops and Products **50**: 145-152.

Mussato, S. I. and Mancilha, I. M. (2007). "Non-digestible oligosaccharides: A review." Carbohydrate Polymers **68**: 587-597.

Nabarlatz, D., Ebringerová, A. and Montané, D. (2007). "Autohydrolysis of agricultural by-products for the production of xylo-oligosaccharides." Carbohydrate Polymers **69**: 20-28.

Nabarlatz, D., Farriol, X. and Montané, D. (2004). "Kinetic modeling of the autohydrolysis of lignocellulosic biomass for the production of hemicellulose-derived oligosaccharides." Industrial & Engineering Chemistry Research **43**: 4124-4131.

Nakakuki, T. (2002). "Present status and future of functional oligosaccharide development in Japan." Pure and Applied Chemistry **65**: 1245-1251.

Nilsson, U. and Nyman, M. (2005). "Short-chain fatty acid formation in the hindgut of rats fed oligosaccharides varying in monomeric composition, degree of polymerisation and solubility." British Journal of Nutrition **94**: 705-713.

Ogier, J. C., Ballerini, D., Leygue, J. P., Rigal, L. and Pourquie, J. (1999). "Ethanol production from lignocellulosic biomass." Oil & Gas Science and Technology **50**: 67-94.

Okamora, K. (1990). "The fiber structure", *em* Wood and cellulosic chemistry. New York, USA, Marcel Dekker, Inc: 89-112.

Oliveira, M., Cabral, L., Leite, M. and Marques, M. (2009). "Pirólise de resíduos poliméricos gerados por atividades offshore." Polímeros **19**: 297-304.

Olsson, L. and Hahn-Hägerdal, B. (1996). "Fermentation of lignocellulosic hydrolysates for ethanol production." Enzyme and Microbial Technology **18**: 312-331.

OMAIA (2011). A produção e comercialização do pêssego em Portugal. Observatório dos Mercados Agrícolas e das Importações Agro - Alimentares http://www.observatorioagricola.pt/item.asp?id_item=106, Data de acesso: 04/11/2011.

Owen, R. W., Giacosa, A., Hull, W. E., Haubner, R., Spiegelhalter, B. and Bartsch, H. (2000). "The antioxidant/anticancer potential of phenolic compounds isolated from olive oil." European Journal of Cancer **36**: 1235-1247.

Palmqvist, E. and Hahn-Hägerdal, B. (2000). "Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: Inhibitors and mechanisms of inhibition." Bioresource Technology **74**: 25-33.

Parajó, J. C., Garrote, G., Cruz, J. M. and Dominguez, H. (2004). "Production of xylooligosaccharides by autohydrolysis of lignocellulosic materials." Trends in Food Science & Technology **15**: 115-120.

Paterson, D. (2009). "Furfural – fuel and flavour molecule of the future?" Chemistry in New Zealand Journal **3**: 2-4.

Pereira, H., Graça, J. and Rodrigues, J. C. (2003). "Wood chemistry in relation to quality", *em* Wood quality and its biological basis. Oxford, UK, Blackwell Scientific: 53-86.

Perugino, G., Trincone, A., Rossi, M. and Moracci, M. (2004). "Oligosaccharide synthesis by glycosynthases." Trends in Biotechnology **22**: 31-37.

Pinto, P. C., Evtuguin, D. V. and Neto, C. P. (2005). Effect of structural features of wood biopolymers on hardwood pulping and bleaching performance. Applied Chemistry. **44**: 9777-9784.

Pinto, P. C. R., Silva, E. A. B. and Rodrigues, A. E. (2010). "Comparative study of solid-phase extraction and liquid-liquid extraction for the reliable quantification of high value added compounds from oxidation processes of wood-derived lignin." Industrial & Engineering Chemistry Research **49**: 12311-12318.

Rahman, E. H. and El-Aah, M. H. A. (1988). "Chemical characterization of peach kernel oil and protein: Functional properties, in vitro digestibility and amino acids profile of the flour." Food Chemistry **28**: 31-43.

Ramos, P., Santos, S. A. O., Guerra, A., Guerreiro, O., Felício, L., Jerónimo, E., Silvestre, A. J. D., Neto, C. P. and Duarte, M. (2013). "Valorization of olive mill residues: Antioxidant and breast cancer antiproliferative activities of hydroxytyrosol-rich extracts derived from olive oil by-products." Industrial Crops and Products **46**: 359-368.

Rivers, D. B. and Emmert, G. H. (1987). "Lignocellulose pretreatment: A comparison of wet and dry ball attrition." Applied Biochemistry and Biotechnology **9**: 365-368.

Roberto, I. C., Mussatto, S. I. and Rodrigues, R. C. L. B. (2003). "Dilute-acid hydrolysis for optimization of xylose recovery from rice straw in a semi-pilot reactor." Industrial Crops and Products **17**: 171-176.

Robinson, R. A. and Stokes, R. H. (2002). "Electrolyte solutions: The measurement and interpretation of conductance, chemical potential and diffusion in solutions of simple electrolytes". London, UK, Butterworths.

Rodríguez, G., Lama, A., Rodríguez, R., Jiménez, A., Guillén, R. and Fernández-Bolaños, J. (2008). "Olive stone an attractive source of bioactive and valuable compounds." Bioresource Technology **99**: 5261-5269.

Roseiro, L. B., Gómez-Ruiz, J. A., Garcia-Risco, M. and Molina, E. (2003). "Vegetable coagulant (*Cynara cardunculus*) use evidenced by capillary electrophoresis permits PDO Serpa cheese authentication1." Lait **83**: 343-350.

Rumpagaporn, P., Kaur, A., Campanella, O., Patterson, J. A. and Hamaker, B. R. (2012). "Heat and pH stability of alkali-extractable corn arabinoxylan and its xylanase-hydrolyzate and their viscosity behavior." Journal of Food Science **71**: 23-30.

Rydholm, S. A. (1965). Pulping Processes. New York, USA, Interscience publishers.

Sánchez-Vicente, Y., Cabañas, A., Renuncio, J. A. R. and Pando, C. (2009). "Supercritical fluid extraction of peach (*Prunus persica*) seed oil using carbon dioxide and ethanol." Journal of Supercritical Fluids **49**: 167-173.

Sasaki, M., Adschiri, T. and Arai, K. (2003). "Fractionation of sugarcane bagasse by hydrothermal treatment." Bioresource Technology **86**: 301-304.

Sassner, P., Galbe, M. and Zacchi, G. (2005). "Steam pretreatment of Salix with and without SO₂ impregnation for production of bioethanol." Applied Biochemistry and Biotechnology **121**: 1101-1118.

Schell, D. J., Torget, R., Power, A., Walter, P. J., Grohmann, K. and Hinman, N. D. (1991). "A technical and economic-analysis of acid-catalyzed steam explosion and dilute sulfuric-acid pretreatments using wheat straw or aspen wood chips." Applied Biochemistry and Biotechnology **28-29**: 87-97.

Selig, M., Weiss, N. and Ji, Y. (2008). "Enzymatic Saccharification of Lignocellulosic Biomass". Innovation for our energy future National Renewable Energy Laboratory (NREL), Golden, Colorado.

Serramia, N., Sanchez-Monedero, M., Fernandez-Hernández, A., Civantos, C. and Roig, A. (2010). "Contribution of the lignocellulosic fraction of two-phase Olive-Mill wastes to the degradation and humification of the organic matter during composting." Waste Management **30**: 1939-1947.

Shoda, S., Fujita, M. and Kobayashi, S. (1998). "Glycanase-catalyzed synthesis of non-natural oligosaccharides." Trends in Glycoscience and Glycotechnology **10**: 279-289.

Sjöström, E. (1993). Wood chemistry: Fundamentals and applications. San Diego, California, Harcourt Brace & Co.

Sluiter, A., Hames, B., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J. and Templeton, D. (2005). "Determination of sugars, byproducts, and degradation products in liquid fraction process samples". Innovation for our energy future National Renewable Energy Laboratory, Golden, Colorado.

Sluiter, A., Hames, B., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., Templeton, D. and Crocker, D. (2008). "Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass". Innovation for our energy future National Renewable Energy Laboratory, Golden, Colorado.

Sun, Y. and Cheng, J. (2002). "Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review." Bioresource Technology **83**: 1-11.

Swennen, K., Courtin, C. M. and Delcour, J. A. (2006). "Non-digestible oligosaccharides with prebiotic properties." Critical Reviews in Food Science and Nutrition **46**: 459-471.

Taherzadeh, M. J., Eklund, R., Gustafsson, L., Niklasson, C. and Lidén, G. (1997). "Characterization and fermentation of dilute-acid hydrolyzates from wood." Industrial & Engineering Chemistry Research **36**: 4659-4665.

Timell, T. E. (1963). Wood hemicelluloses. Syracuse, Sicily, Italy, Interscience

Torget, R., Walter, P., Himmel, M. and Grohmann, K. (1991). "Dilute-acid pretreatment of corn residues and short-rotation woody crops." Applied Biochemistry and Biotechnology **28-29**: 75-86.

Torrado, I., Bandeira, F., Shatalov, A., Carvalheiro, F. and Duarte, L. (Forthcoming). "The impact of particle size on the selective fractionation of giant reed biomass using dilute acid hydrolysis." Electronic Journal of Energy & Environment

Trugilho, P., Lima, J. and Mendes, L. (1996). "Influência da idade nas características físico-químicas e anatómicas da madeira de *Eucalyptus saligna*". Cerne **2**: 94-111.

Vázquez, M. J., Alonso, J. L., Domínguez, H. and Parajó, J. C. (2000). "Xylooligosaccharides: manufacture and applications." Trends in Food Science & Technology **11**: 387-393.

Vidal, B., B., D., Ting, K. and Singh, Y. (2011). "Influence of feedstock particle size on lignocellulose conversion-a review." Applied Biochemistry and Biotechnology **164**: 1405-1421.

Vila, C., Garrote, G., Domínguez, H. and Parajó, J. C. (2002). "Hydrolytic processing of rice husks in aqueous media: A kinetic assessment." Collection of Czechoslovak Chemical Communications **67**: 509-530.

Voragen, A. G. J. (1998). "Technological aspects of functional food-related carbohydrates." Trends in Food Science & Technology **9**: 328-335.

Wang, Q., Ellis, P. R. and Ross-Murphy, S. B. (2000). "The stability of guar gum in an aqueous system under acidic conditions." Food Hydrocolloids **14**: 129-134.

Watanabe, T., Shida, M., Muryama, T., Furuyama, Y., Nakajima, T. and Matsuda, K. (1984). "Xyloglucans in cell walls of rice hull." Carbohydrate Research **129**: 229-242.

Yang, B. and Wyman, C. E. (2006). "BSA treatment to enhance enzymatic hydrolysis of cellulose in lignin containing substrates." Biotechnology and Bioengineering **94**: 611-617.

Zaho, Y.-y. (2012). "Amygdalin content in four stone fruit species at different developmental stages." ScienceAsia **38**: 218-222.

6 Anexos

A. Determinação das atividades enzimáticas

I. Método do DNS

A quantificação das atividades enzimáticas de FPAse, de celobiose e de Endoglucanase é feita tendo por base a quantificação das concentrações de glucose (mg/mL) determinadas através do método do DNS, o ácido 3,5-dinitrosalicílico (Miller 1959).

Este método baseia-se na redução, em meio alcalino, do DNS a ácido 3-amino-5-nitrossalicílico (uma substância corada que absorve fortemente a 540 nm), pelos glícidos redutores, sendo os grupos carbonilo do glícido oxidados a carboxilo. A presença em solução do sal de *Rochelle* justifica-se como proteção do reagente ao oxigénio dissolvido.

Preparação do reagente DNS:

Adicionar 50 mL de hidróxido de sódio (NaOH) 2N a 2,5 g de DNS e aproximadamente 125 mL de água destilada e agitar até à dissolução. Posteriormente, adicionar 75g do sal de *Rochelle* (Tartarato duplo de sódio e potássio) e perfazer o volume para 250 mL com água destilada. Faz-se notar que esta solução é diferente da proposta no protocolo do NREL (Adney and Baker 2008), no entanto tem sido utilizada com sucesso no laboratório do LNEG.

Obtenção da curva padrão:

De acordo com o quadro 16, são preparadas 5 diluições a partir de uma solução padrão de glucose 10 mM, às quais se adicionam 0,5 mL de solução de DNS.

Quadro 16 Preparação da curva de calibração do método do DNS

| Tubos | Glucose (10mM) (mL) | Vágua (mL) | DNS (mL) |
|-------|------------------------|------------|----------|
| 1 | 0,0 | 0,75 | 0,5 |
| 2 | 0,1 | 0,65 | |
| 3 | 0,2 | 0,55 | |
| 4 | 0,3 | 0,45 | |
| 5 | 0,4 | 0,35 | |

Seguidamente, os tubos são agitados e colocados num banho de água em ebulição durante 5 min. Terminada a reação, deixam-se arrefecer os tubos, à temperatura ambiente e, perfaz-se o volume para 5mL, com água destilada. Seguidamente é feita a leitura das absorvências no espectrofotómetro JASCO a 540 nm.

II. Cálculo das atividades enzimáticas

Após construída a reta de calibração, as diluições usadas para cada enzima, são traduzidas em termos de concentração de enzimas de acordo com a expressão seguinte:

$$[enzimas] = \frac{1}{D} = \frac{V_{enz}(dil)}{V_{total}(dil)} \quad \text{Equação 10}$$

onde D é a diluição, Venz(dil) é o volume da enzima na diluição e Vtotal(dil) é o volume total de diluição.

Para calcular a atividade enzimática de **FPase** (FPU/mL), após tradução das diluições em termos de concentração de enzimas, são estimadas as concentrações de enzima necessárias para libertar exatamente 0,5 mg de glucose, traçando uma curva da glucose libertada em função da concentração das enzimas. Finalmente a atividade da FPase é calculada a partir da expressão:

$$FPase (FPU/mL) = \frac{0,37}{[Enzima]_{0,5Glc}} \quad \text{Equação 11}$$

onde [Enzima]_{0,5Glc} é a concentração de enzima necessária para libertar 0,5 mg de glucose (Ghose 1987).

Para determinar a atividade enzimática de **celobiase** (IU/mL), são estimadas as concentrações de enzima necessárias para libertar exatamente 1,0 mg de glucose, traçando uma curva da glucose libertada em função da concentração das enzimas. Finalmente a atividade da Celobiase é calculada segundo a expressão:

$$Celobiase (IU/mL) = \frac{0,0926}{[Enzima]_{1Glc}} \quad \text{Equação 12}$$

onde [Enzima]_{1Glc} é a concentração de enzima necessária para libertar 1,0 mg de glucose (Ghose 1987).

Para determinar a atividade enzimática de **Endoglucanase** (IU/mL), são estimadas as concentrações de enzima necessárias para libertar exatamente 0,5 mg de glucose,

traçando uma curva da glucose libertada em função da concentração das enzimas. Finalmente a atividade da Celobiase é calculada segundo a expressão:

$$\textbf{\textit{Endoglucanase}} \textbf{ (IU/mL)} = \frac{0,185}{[\textbf{\textit{Enzima}}]_{0,5\textbf{\textit{Glc}}}} \quad \text{Equação 13}$$

onde $[\text{Enzima}]_{0,5\text{Glc}}$ é a concentração de enzima necessária para libertar 0,5 mg de glucose (Ghose 1987).

B. Formulário

III. Métodos analíticos

A humidade (H) das amostras foi calculada segundo a seguinte equação:

$$\%H = \frac{\text{Peso da amostra húmida (g)} - \text{Peso amostra seca (g)}}{\text{Peso da amostra húmida (g)}} \times 100 \quad (\text{Equação 14})$$

A cinza (Cin_z) das amostras foi calculada usando a seguinte expressão:

$$\%Cin_z = \frac{\text{Peso da cinza (g)}}{\text{Peso da amostra seca (g)}} \times 100 \quad (\text{Equação 15})$$

A percentagem de extratáveis é determinada pela equação seguinte:

$$\text{Extratáveis (\%)} = \frac{m - m_0}{A(1-H)} \times 100 \quad (\text{Equação 16})$$

Onde,

m é a massa do balão mais extratáveis, após cada uma das extrações (g);

m₀ é a massa do balão (vazio) determinada inicialmente (g);

A é a massa da amostra (g) pesada para dentro do cartucho.

H é a humidade da amostra

A percentagem de azoto total é calculada através de:

$$\text{Azoto total (\%)} = 0,14 \cdot \left(\frac{V - V_0}{A} \right) \quad (\text{Equação 17})$$

Onde,

V é o volume de solução de HCl 0,1 N gasto na titulação (mL);

V₀ é o volume da solução de HCl 0,1 N gasto na titulação do ensaio em branco (mL);

A é a massa de amostra (g) (em massa seca)

O fator de conversão utilizado para o cálculo da proteína foi N x 6,25.

IV. Quantificação de polissacarídeos estruturais e lenhina em amostras sólidas

As concentrações de glucose, xilose, arabinose e ácido acético nos licores resultantes da hidrólise ácida quantitativa da matéria-prima e resíduo sólido foram utilizados para o cálculo das percentagens de glucanas, xilanas, arabinanas e grupos acetilo, respetivamente (Equações 13 - 16). O resíduo insolúvel em ácido, após correção da cinza, permitiu o cálculo da lenhina Klason (Equação 17)

Na hidrólise ácida dos resíduos sólidos resultantes da auto-hidrólise, uma pequena percentagem de monossacarídeos é degradada, por isso são introduzidos fatores de correção para corrigir as perdas. De acordo com Browning (Browning 1967) essas perdas são de 2,6% para a glucose, 8,8% para a xilose e 4,7% para a arabinose. Com base nestas percentagens é possível calcular os fatores de correção (F), que permitem corrigir as várias determinações.

$$Gn = F \times \frac{100}{1005} \times \frac{162}{180} \times \frac{Glc \times P_{sol}}{A} \quad (\text{Equação 18})$$

$$Xn = F \times \frac{100}{1005} \times \frac{132}{150} \times \frac{Xyl \times P_{sol}}{A} \quad (\text{Equação 19})$$

$$Arn = F \times \frac{100}{1005} \times \frac{132}{150} \times \frac{Ara \times P_{sol}}{A} \quad (\text{Equação 20})$$

$$Ac = \frac{100}{1005} \times \frac{60}{61} \times \frac{HAc \times P_{sol}}{A} \quad (\text{Equação 21})$$

$$LK = \frac{RIA - Cin_z}{A} \times 100 \quad (\text{Equação 22})$$

Onde,

Gn, Xn, Arn, Ac, LK são as percentagens de glucanas, xilanas, arabinanas, grupos acetilo e lenhina klason (g por 100 g de sólido), respetivamente;

Glc, Xyl, Ara e HAc são as concentrações de glucose, xilose, arabinose e ácido acético nos licores (gL⁻¹), respetivamente;

Os termos $\frac{162}{180}, \frac{132}{150}, \frac{60}{61}$ são fatores estequiométricos de conversão de monómeros em polissacarídeos;

F é o fator de correção, por exemplo, para as glucanas, $F = \frac{1}{1-0,026} = 1,027$;

P_{sol} e A são os pesos da solução e da amostra seca utilizada no ensaio, respetivamente (g);

RIA e Cin_z são os pesos do resíduo insolúvel em ácido e das cinzas da amostra, respetivamente (g).

V. Cálculo de rendimentos

O rendimento de cada um dos polissacarídeos, grupos acetilo e lenhina, expresso como a percentagem que permanece no resíduo sólido relativamente à respetiva percentagem na matéria-prima, após hidrólise foi calculada de acordo com as equações seguintes (Equações 18 - 22).

$$Gn_R = \frac{Gn \times Y_S}{Gn_{MP}} \quad (\text{Equação 23})$$

$$Xn_R = \frac{Xn \times Y_S}{Xn_{MP}} \quad (\text{Equação 24})$$

$$Arn_R = \frac{Arn \times Y_S}{Arn_{MP}} \quad (\text{Equação 25})$$

$$Ac_R = \frac{HAc \times Y_S}{Ac_{MP}} \quad (\text{Equação 26})$$

$$LK_R = \frac{LK \times Y_S}{LK_{MP}} \quad (\text{Equação 27})$$

Onde,

Gn_R, Xn_R, Arn_R, Ac_R, LK_R são as percentagens de glucanas, xilanas, arabinanas, grupos acetilo e lenhina Klason que permanecem no resíduo, após o processamento hidrotérmico (g/100 g matéria-prima);

Gn_{MP}, Xn_{MP}, Arn_{MP}, Ac_{MP}, LK_{MP} são as percentagens de glucanas, xilanas, arabinanas, grupos acetilo e lenhina Klason na matéria-prima, respetivamente (g/100 g matéria-prima);

Y_s é o rendimento em sólidos (g de sólido recuperado/100 g matéria-prima).

A percentagem de cada um dos polissacarídeos e grupos acetilo solubilizados a monómeros, bem como, a percentagem de monómeros convertida nos respetivos produtos de degradação, foi calculada de acordo com as seguintes equações (Equações 28 -33).

$$Glc_s = \frac{162}{180} \cdot \frac{Glc \cdot P_H}{Gn_{MP} \cdot A \cdot 0,01 \cdot \rho_H} \cdot 100 \quad \text{Equação 28}$$

$$Xyl_s = \frac{132}{150} \cdot \frac{Xil \cdot P_H}{Xn_{MP} \cdot A \cdot 0,01 \cdot \rho_H} \cdot 100 \quad \text{Equação 29}$$

$$Ara_s = \frac{132}{150} \cdot \frac{Ara \cdot P_H}{Arn_{MP} \cdot A \cdot 0,01 \cdot \rho_H} \cdot 100 \quad \text{Equação 30}$$

$$HAc_s = \frac{60}{61} \cdot \frac{HAc \cdot P_H}{Ac_{MP} \cdot A \cdot 0,01 \cdot \rho_H} \cdot 100 \quad \text{Equação 31}$$

$$Furf_s = \frac{132}{96} \cdot \frac{Furf \cdot P_H}{Xn_{MP} \cdot A \cdot 0,01 \cdot \rho_H} \cdot 100 \quad \text{Equação 32}$$

$$HMF_s = \frac{162}{126,1} \cdot \frac{HMF \cdot P_H}{Gn_{MP} \cdot A \cdot 0,01 \cdot \rho_H} \cdot 100 \quad \text{Equação 33}$$

Onde,

Glc_s , Xyl_s , Ara_s , HAc_s , $Furf_s$, HMF_s , são as percentagens de glucose, xilose, arabinose, ácido acético, furfural e HMF recuperados no hidrolisado (g/100 g de polissacarídeos/grupos acetilo/ lenhina presentes na matéria-prima);

Furf e HMF são as concentrações de furfural e HMF nos licores ($g \cdot L^{-1}$);

P_H é a massa de hidrolisado obtido no ensaio (g);

A é a massa de amostra utilizada no ensaio (g);

ρ_H é a massa volúmica do hidrolisado ($g \cdot L^{-1}$).

As percentagens de oligossacarídeos de glucose (GOS_s), de xilose (XOS_s) e de arabinose (AOS_s), recuperados licores (g/100g de glucanas, xilanas e arabinanas,

respetivamente) foram calculadas de acordo com as seguintes expressões (Equações 34 - 36).

$$GOS_S = \frac{Gn \cdot P_H}{Gn_{MP} \cdot A} \cdot 100 - Glc_S \quad (\text{Equação 34})$$

$$XOS_S = \frac{Xn \cdot P_H}{Xn_{MP} \cdot A} \cdot 100 - Xyl_S \quad (\text{Equação 35})$$

$$AOS_S = \frac{An \cdot P_H}{An_{MP} \cdot A} \cdot 100 - Ara_S \quad (\text{Equação 36})$$

Onde,

Gn, Xn e An são as percentagens de glucanas, xilanas e arabinanas, expressas em g/100 g sólido;

Gn_{MP}, Xn_{MP} e An_{MP} são as percentagens de glucanas, xilanas e arabinanas na matéria-prima, respetivamente, expressas em g/100 g de polissacarídeos na matéria-prima;

Glc_S, Xyl_S e Ara_S são as percentagens de glucose, xilose e arabinose recuperados nos licores, respetivamente, expressas em g/100 g de polissacarídeos na matéria-prima;

P_H é a massa de hidrolisado obtido no ensaio (g) e A a massa de amostra seca utilizada no ensaio (g).